



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

"DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA  
*L. interrogans* EN UNA POBLACION DE EQUINOS  
DEDICADOS A LA PRODUCCION DE SUEROS  
HIPERINMUNES"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**MARGARITA LOPEZ PEREZ**

ASESORES: M.V.Z. M. Sc. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA  
M.V.Z. CARLOS RUBEN ORTEGA SANCHEZ  
M.V.Z. DANIEL ATILANO LOPEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES-CUAUTITLAN

INSTITUTO NACIONAL  
 DE ESTADISTICA Y  
 CENSO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Detección de anticuerpos contra la Interferencia en una población de equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes".

que presenta la pasante: López-Pérez Margarita  
 con número de cuenta: 86120000-2 para obtener el TITULO de:  
Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI FAZA HARÉ EL ESPERITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 12 de agosto de 1977

PRESIDENTE MVZ. Sergio Cortés y Huerta 12 Agosto - 77

VOCAL MVZ. José Roberto López

SECRETARIO M. en C. Alexandra de la Peña Noctepuma

PRIMER SUPLENTE MVZ. Manoel Antonio Miranda Saavedra

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Rafael Rodríguez

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; por brindarme los principios básicos para ejercer esta profesión.

Al MVZ, M.Sc. Alejandro de la Peña, por leer y corregir la tesis cuantas veces fué necesario, así como dedicar parte de su tiempo en mi formación profesional.

A los MVZ Carlos Ortega y Alejandro Mariscal, por su amistad, colaboración y apoyo en la realización de este trabajo.

Al MVZ Daniel Atilano, por sus comentarios que enriquecieron el trabajo de tesis.

Al Centro de Producción de Sueros Hiperinmunes (INH), y el Laboratorio de Diagnóstico de Microbiología de la FMVZ (UNAM); por abrir un espacio en sus actividades para la realización del trabajo experimental.

A mis amigos, por su amistad que es un gran tesoro difícil de encontrar.

A los caballos productores de sueros hiperinmunes, por sus cualidades como especie.

## RESUMEN.

Se colectaron sueros de 106 equinos de 1 a 21 años (89 machos y 17 hembras), del Instituto Nacional de Higiene; destinados a la producción de sueros hiperinmunes. Se realizó la prueba de aglutinación microscópica (AM) contra 19 serovariedades de *Leptospira spp.* patógenas considerando positivas las diluciones 1:100 o superiores; encontrándose 83.9% positivos a una o más serovariedades con títulos 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. Se utilizaron pruebas de inmunodifusión doble en agar (IDD), contra inmunolectroforesis (CIEF), eligiendo 48 sueros con títulos de 1: 400 o superiores para descartar reacciones cruzadas, debido al estado inmunológico de los equinos; encontrándose sólo un caso de identidad inmunológica total (0.02%), detectado entre el virus rábico y la serovariedad *pomona* (suero 545) en IDD; en CIEF no se detectaron líneas de precipitación. Con el mismo fin, se prepararon antisueros en 5 conejos contra los antígenos utilizados para inmunizar a los equinos (virus rábico, toxoide tetánico, toxoide diftérico, veneno de alacrán y veneno de serpientes), con los cuales se corrió la prueba de AM, no encontrando títulos contra leptospira en la dilución 1: 50.

Después de los 12 meses del muestreo murieron 59 equinos (55.6%) a consecuencia de diversas lesiones como: hepatopatías, nefropatías, enteritis hemorrágicas y congestión pulmonar; encontrando 9 de los 59 animales con lesiones posibles de leptospirosis y con títulos de anticuerpos  $\geq 1:400$  en la AM (15.2%).

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Leptospirosis	2
1.1.1. Agente etiológico	2
1.1.2. Epizootiología	7
1.1.3. Signología	12
1.1.4. Patogenia	16
1.1.5. Diagnóstico	21
1.1.6. Tratamiento	26
1.1.7. Control	29
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1. Pruebas de inmunodifusión	35
4.1.1. Preparación del antígeno soluble de leptospira	35
4.1.2. Inmunodifusión doble	37
4.1.3. Contrainmunolectroforesis	38
4.1.4. Inmunización en conejos	41
4.1.5. Lesiones en los equinos	41
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>
<b>IX. APÉNDICE I</b>	<b>80</b>
<b>X. APÉNDICE II</b>	<b>81</b>

## INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Higiene dependiente de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud, tiene como una de sus funciones producir sueros y vacunas destinados a prevenir, tratar y diagnosticar diversas enfermedades endémicas. Los sueros hiperinmunes son biológicos que se obtienen del suero de animales previamente inmunizados contra una enfermedad específica y contienen anticuerpos que una vez concentrados y purificados pueden aplicarse al hombre y a los animales domésticos, para el tratamiento de enfermedades de alta incidencia, curso agudo y mortalidad elevada (7, 10, 87).

Los animales de elección para la producción de sueros hiperinmunes son los caballos; esto se debe a ciertas características como obtención de sangrías hasta de 10 litros diarios durante 2 o 3 días consecutivos, períodos prolongados para mantener títulos altos de anticuerpos, la rápida sedimentación de glóbulos rojos favoreciendo el proceso de plasmaféresis (es la acción de transfundir al caballo el paquete celular suspendido en solución salina después de extraerse el plasma), así como la relativa tolerancia al suero de esta especie por el organismo humano (111).

Sin embargo esta especie está expuesta a sufrir diferentes disfunciones orgánicas observando diversas lesiones en forma recurrente tales como: oftalmias

periódicas, neumonías, nefritis, glomerulonefritis, cirrosis, hepatomegalia, hepatitis, anemias que obedecen principalmente a la constante estimulación antigénica, constantes sangrías y otros factores (7).

### **LEPTOSPIROSIS.**

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana, mundial que afecta a los humanos y diversos mamíferos silvestres y domésticos, causado por los miembros del género *Leptospira spp.* La leptospirosis clínica es más comúnmente asociada con especies domésticas como los bovinos, cerdos, perros y muy pocas veces reportada en los pequeños rumiantes y equinos (3, 13, 17, 66, 124).

Sin embargo estudios serológicos internacionales han revelado que la exposición de los equinos hacia las leptospirosis es muy común (11, 66), considerándoles hospedadores comunes de la serovariedad *bratislava* (47, 84, 113, 161).

### AGENTE ETIOLÓGICO

Las leptospirosis son espiroquetas que miden de 0.1 a 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 6 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud (13, 85, 117). La célula consta de una membrana citoplasmática con una pared de peptidoglicano y una envoltura superficial con varias capas comparables a las bacterias Gram negativas (108). Sus extremos

tienen forma de ganchos y presentan 2 flagelos periplásmicos (FP), también conocidos como filamento axial y endoflagelo. Estos flagelos están insertos cerca de la membrana citoplasmática en ambos extremos, extendiéndose entre el espacio periplásmico (19).

Los FP son estructuras complejas que consisten de 2 vainas tubulares y dan la consistencia sólida a la parte interna (154). El cilindro citoplasmático donde se encuentra inserto el flagelo, tiene una capa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática. La envoltura contiene lipooligosacárido ( LOS ), proteínas y fosfolípidos (91, 117).

Esta bacteria pertenece a la familia Leptospiraceae, conteniendo a los géneros *Leptospira* y *Leptonema* (117). El género *Leptospira* ha sido dividido en 190 diferentes serovariedades ordenadas antigénicamente en 25 serogrupos (117) (Tabla 1).

El estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ADN cromosomal ha dividido al género en 7 especies de importancia médica: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirshneri* (*L. alstonii*), *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* (118, 164), además de 3 especies no patógenas *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachii* (164).

<b>Tabla 1. Serogrupos de <i>Leptospira interrogans</i>.</b>	
<b>Número</b>	<b>Serogrupos</b>
1	Australis
2	Autumnalis
3	Ballum
4	Bataviae
5	Canicola
6	Celledoni
7	Cynopteri
8	Djasiman
9	Grippityphosa
10	Hebdomadis
11	Icterohaemorrhagiae
12	Javanica
13	Louisiana
14	Lyme
15	Manhao
16	Mini
17	Panama
18	Pomona
19	Pyrogenes
20	Ranarum
21	Sarmin
22	Sejroe
23	Shermani
24	Tarassovi
25	Aun no designado

\* Tomado del Instituto Pasteur :<http://www.pasteur.fr/Bio/Leptospira/Interrogans.html>

Hay muy poca información acerca de los factores de virulencia de las leptospiras. Las leptospiras invaden al hospedador por membranas mucosas; las

cepas virulentas se dirigen hacia las células epiteliales (líneas *in vitro*), siendo más eficientes que las cepas no virulentas (6, 138) y atacan a los constituyente de la matriz extracelular, ejemplo: colágeno y fibrinogéno (77).

La adhesión parece ser un proceso activo que involucra superficies proteicas de la leptospira siendo aún no identificadas (149). Las leptospiras patógenas también invaden epitelios y otro tipo de células como las hepáticas y renales (100, 156).

La producción de hemolisinas por parte de algunas serovariedades de leptospiras, contribuye a la producción de hemoglobinuria y anemia hemolítica (13, 150).

La inducción de TNF -  $\alpha$  (factor alfa de necrosis tumoral), daña las células endoteliales, resultando en hemorragias y sangrado anormal, así como coagulación diseminada intravascular, que son vistas en leptospirosis aguda. Una cepa virulenta de la serovariedad *icterohaemorrhagiae*, mostró producir grandes efectos procoagulantes que cepas no virulentas incubadas en monocitos humanos *in vitro* (101).

Un mecanismo importante de virulencia es la actividad endotóxica del Lipooligosacáridos (LOS); Isogai *et al* (1989), detectó diferencias en el efecto del LOS de diferentes serovariedades que causan trombocitopenia y agregación

plaquetaria. El contenido de LOS de cepas virulentas y no virulentas de serovariedades en particular pueden diferir (61, 109).

La toxicidad y efecto mutagénico de lípido A aislado del LOS, ha sido reportado por mucho más bajo grado que aquellos lipopolisacáridos de *E. coli* o *Salmonella* (127, 132, 155).

El LOS leptospiral ha mostrado ser fuertemente liberador de citoquinas de monocitos (74).

Estudios recientes han mostrado al LOS como el componente antigénico más importante en leptospiras (2). En la ausencia de anticuerpos específicos, el contenido LOS de la pared celular es considerado como responsable para la resistencia de las leptospiras a los efectos bactericidas del suero normal (76).

La esfingomielinasa C, ha sido reconocida sólo en cepas patógenas (8), se ha reportado una correlación de virulencia entre la actividad de la esfingomielinasa con la fosfolipasa A, para las cepas del serogrupo Pomona ( 13, 35, 115, 127, 128, 129, 159). Aunque la patogénesis de ambas enzimas es especulativa, no se descarta que pueden realizar efectos citolíticos que van a proveer beneficios nutricionales a la bacteria, por la liberación de hierro y ácidos grasos disponibles (99).

## EPIZOOTIOLOGÍA.

La leptospirosis es probablemente una enfermedad que se presenta en un 60% de la población bovina y debido a las pérdidas que ocasiona se le considera una de las 3 principales enfermedades que afectan a la ganadería (3, 15, 16, 37).

Es una infección zoonótica y los humanos adquieren la infección a partir de una extensa variedad de animales portadores a menudo de aguas contaminadas con orina representando un riesgo ocupacional para carniceros, granjeros y veterinarios, así como para propietarios de mascotas (3, 17, 37, 41, 42, 50, 81, 91, 160).

La humedad es un factor importante que rige la persistencia del microorganismo en camas o suelos, persistiendo hasta 183 días en lugares encharcados o 30 min. cuando el suelo se seca con el aire (17).

Las leptospiras mueren por congelamiento, calor ( $56^{\circ}\text{C}/20$  min.), jabón, sales biliares, detergentes, pH ácidos y putrefacción (13, 98); son sensibles a los antibióticos como estreptomina, penicilinas así como las tetraciclinas (103, 108); pero tienen una natural resistencia a las sulfonamidas (15).

En el curso de una leptospirosis se eliminan hasta  $10^7$  leptospiras por ml de orina, las cuales sobreviven más tiempo en la orina neutra o ligeramente alcalina. Por esta razón, los herbívoros desempeñan un papel importante en la transmisión

que los carnívoros cuya orina es ácida y en donde las leptospiras sobreviven por períodos más cortos (1 a 2 hrs.) (72, 108).

Por otro lado las leptospiras se han aislado incluso de especies como anfibios, artrópodos, aves y reptiles (146).

El hábitat natural de las leptospiras patógenas son los túbulos contorneados proximales del riñón y algunas veces el tracto genital (117).

La leptospira se establece en riñón propagándose al lumen de túbulos proximales y ahí no esta sujeta a la acción de anticuerpos del hospedero (72).

La producción de ureasa por *Leptospira spp.* patógena puede ser importante para la colonización del riñón, eliminándose el microorganismo en la orina durante la última fase clínica y continuá en las fases de convalecencia y recuperación (72, 151).

Por lo regular hay una evidente adaptación de ciertas serovariedades en algunas especies de animales, persistiendo la infección por mucho tiempo en hospedadores específicos; por ejemplo: las cerdas pueden actuar como portadores hasta 2 meses, en bovinos durante un promedio de 36 días (10 a 180 días), desempeñando una importante función en la epidemiología de la leptospirosis (15).

Los equinos constituyen también una fuente dudosa de infección ya que en ellos su leptospiruria es moderada si bien puede prolongarse hasta 4 meses (17, 117).

Aunque determinadas serovariedades muestran cierta especificidad de huésped, no puede ser calificada ésta de constante; más bien es característico de las leptospiras que cambien las relaciones del parásito y el huésped según la situación epidemiológica local y varía la adaptación a uno nuevo. Así la rata, por ejemplo, es el huésped principal del serovariedad *L. canicola* en determinadas regiones (108).

Este fenómeno explica la existencia de diversos ciclos de contagio entre los roedores, los animales domésticos y el hombre en determinadas regiones. Por lo tanto, la expresión "huésped específico" puede tener valor únicamente durante un tiempo limitado y para una situación epidemiológica definida (108).

El hospedador incidental es infectado por transmisión directa a través de orina infectada, placenta, tejido fetal o indirectamente a través de contacto con el agua y alimentos contaminados (15, 17).

La transmisión venérea de la serovariedad *bratislava* en el caso del cerdo puede ser importante, en otras especies ésta transmisión es limitada (12, 117, 153).

La transmisión vertical de la madre al feto puede ocurrir en varias especies por ejemplo: *hardjo- bovis* en vacas pero la mayoría de las infecciones ocurren a través de la mucosa nasal, genital, ocular o abrasiones en la piel (12, 51, 72, 117, 124).

La transmisión entre caballos no existe prácticamente, excepto con la posibilidad de infección al potro durante el período prenatal y perinatal (43).

La leptospirosis se presenta en un 10% de la población equina, afectando a la mayoría de los caballos de 4 años de edad, manifestando lesiones en uno o ambos ojos (33, 43).

Los serogrupos que más comúnmente se han manifestado en los equinos son *Icterohaemorrhagiae* y *Australis (bratislava)* (48, 66, 113).

El primer reporte sobre la infección natural por leptospiras en equinos fue publicada en Rusia en 1947 (93, 94). En Norteamérica en 1952, se reportaron casos de aborto, mortinatos, muerte neonatal, disfunción renal y hepática, así como oftalmía periódicas (89). En Estados Unidos se aisló la serovariedad *pomona*, en Argentina *hardjo*, en Europa además de *pomona* se aislaron *icterohaemorrhagiae*, *sejroe* y *canicola* (3).

Estudios serológicos en equinos han identificado que la exposición hacia las leptospiras se presenta a nivel mundial (12, 21, 23, 48, 59, 66, 67, 82, 83, 113,

136, 142, 158, 165). Los serogrupos predominantes varían con la distribución geográfica y la serovariedad usada en estudio.

Estudios serológicos en Inglaterra, identificaron 34.6% de 500 equinos clínicamente normales con títulos  $\geq$  1:100 (66).

En Irlanda 89.1% de sueros de 650 yeguas fueron positivos para antígenos aglutinantes hacia leptospira; la serovariedad predominante fue *bratislava* con un 81.8% de yeguas positivas; además, de los riñones de 12 de 91 equinos examinados a la necropsia se aisló esta serovariedad; estos equinos no presentaban signos clínicos de leptospirosis (49).

Recientes estudios serológicos en Canadá, Holanda y los Estados Unidos, han identificado una prevalencia alta de anticuerpos en los equinos para la serovariedad *bratislava* con la ausencia de signos clínicos (12, 83, 89). Por lo que algunos autores contemplan que el equino puede ser reservorio de esta serovariedad (43).

Cacchione y cols. (1976), en Argentina examinaron serológicamente 350 equinos encontrando 91.1% de animales positivos y aislaron la serovariedad *hardjo* (21). En contraste Giorgi *et al.* (1980), en Brasil, obtuvieron de 1653 equinos, 4.53% de reacciones positivas, siendo *icterohaemorrhagiae* y *javanica* los de más alta incidencia (59). En 1988 en los Estados Unidos, se detectó la

prevalencia de anticuerpos contra leptospiras en 222 equinos contra *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *hardjo*, *grippotyphosa* y *bratislava* en un 24.8% de reacciones a una o más serovariedades (113).

En México, la leptospirosis ha sido poco estudiada y puede pasar desapercibida; en 1972 Legorreta, realizó un estudio serológico de 200 equinos del D.F. encontrando 8.5% de animales positivos, detectando las siguientes serovariedades: *ballum*, *borincana*, *hardjo*, *pomona* y *pyrogenes* (90).

## SIGNOLOGÍA

La gravedad de la infección depende de la virulencia de la serovariedad y la respuesta inmune del hospedador (100, 146).

La leptospirosis se caracteriza por manifestaciones extremadamente variadas; muchos animales que sin duda no manifiestan signos clínicos, consecuentemente tienen lesiones poco definidas, algunos se recuperan de la infección y se convierten en portadores, en tanto que en otros la enfermedad se desarrolla en forma aguda y fatal.

Los animales infectados experimentan la forma aguda y severa (septicemia con evidencia de endotoxemia, hemorragias, hepatitis, nefritis, meningitis); subaguda y moderadamente severa (nefritis, hepatitis, agalactia, meningitis);

enfermedad crónica (iridociclitis, aborto, nacimiento prematuro, infertilidad) o la forma subclínica, reconocida sólo por el desarrollo de anticuerpos (117).

Generalmente la leptospirosis en equinos se presenta en forma subclínica ó crónica y muchas veces se reconoce a la oftalmía periódica como secuela de la enfermedad, sin embargo no es la única signología de la leptospirosis, presentándose ictericia transitoria, depresión, pirexia y abortos (12, 17, 37, 48, 72, 124).

El problema ocular es conocido por varias sinonimias como: oftalmía periódica, ceguera lunar e iridociclitis; pero la forma más descriptiva es uveitis recurrente equina (URE) (33, 80, 92).

Afecta a 3 porciones del tracto uveal: iris, cuerpo ciliar y coroides, dependiendo de la lesión se reconocen a la uveitis anterior (inflamación del iris y cuerpo ciliar) y la uveitis posterior (coroiditis) Figura 1. (71, 80, 125).

La Etiología ha sido discutida por varios autores, mencionando, entre otras causas, una reacción de hipersensibilidad del tipo III o IV, así como una reacción hacia un agente infeccioso o hacia el propio tejido ocular, esto debido a una intensa reacción de inflamación; activación de las células T, resultando en una recurrencia de la uveitis por reexposición del tracto uveal a partículas infecciosas con una subsecuente memoria y la proliferación de células T (68, 80, 95, 104).



**Figura 1.- Equino con problema de oftalmía periódica (# 32).**

Los organismos que han sido involucrados en URE son: *Leptospira spp.* y *Onchocercaria spp.* (5). Otros como *Brucella abortus*, *Streptococcus equi*, *Toxoplasma gondii*, influenza virus, arteritis equina y posiblemente anemia infecciosa equina, también han sido implicados aunque no se han aislado de equinos afectados con URE (80, 125)

De todos los agentes infecciosos relacionados con URE, *Leptospira spp.* es más comúnmente involucrada como agente causal directo. En 2 casos de uveítis anterior recurrente reportados por Davidson *et al.*, demostraron títulos de anticuerpos más altos en humor acuoso que en suero; para 3 serovariedades: *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *hardjo*. Resultados de cultivos en ambos casos fueron negativos para bacterias aeróbicas y parásitos (34, 80).

Otras de las serovariedades involucradas en URE son: *autumnalis*, *bratislava*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *sejroe* (34, 96, 126, 134).

La uveítis se manifiesta después de un período latente a veces de 12 a 24 meses, observándose fotofobia, epífora, blefaroespasmos, hiperemia conjuntival, opacidad corneal, hipopión y miosis (33, 80, 125, 141). Las deficiencias visuales pueden desarrollarse si la uveítis persiste, resultando en la formación de cataratas, alteración del color del iris, atrofia del cuerpo nigricans y corioretinitis (24, 33, 37, 80, 125, 134).

Por otro lado, los resultados de una subsecuente localización de leptospiras en el útero son: aborto, mortinatos y nacimientos prematuros; la yegua inicia en un período de 7 a 10 días, con pirexia, depresión, ictericia, anorexia y aborto que ocurre en la segunda mitad de la gestación, detectándose títulos de anticuerpos de 1: 500 a 1: 5000 (11, 71).

71 casos confirmados de leptospirosis, de los cuales 55 fueron casos de abortos y 16 mortinatos de yeguas con diferentes períodos de gestación entre 3 ½ a 11 meses, demostraron la presencia de leptospiras, en 56 fetos por medio de la prueba de anticuerpos fluorescentes y del aislamiento en medios de cultivo, a partir de 20 de 42 muestras de tejido fetal. 60 de los aislamientos fueron identificados por análisis de restricción enzimática como serogrupo Pomona, serovariedad *kenewicki* y *grippotyphosa*, además de 2 aislamientos que no se identificaron (114).

#### PATOGENIA.

##### Vías de entrada.

Las leptospiras pueden penetrar en forma intacta a través de mucosas y piel lesionada (91, 124, 146). Posteriormente las leptospiras entran en el torrente circulatorio y son rápidamente transportadas a todas partes del organismo, incluyendo bazo, hígado, líquido cefaloraquídeo y humor acuoso (151).

Las leptospiras se multiplican a partir de la lesión para establecer una bacteremia de duración variable, se presenta 2 fases en el curso de la enfermedad: Fase septicémica.- Cuando los gérmenes se encuentran en la sangre y órganos parenquimatosos (periodo de incubación en animales domésticos es usualmente de 10 a 12 días con rangos de 3 a 30 días) (151).

Fase tóxica.- A partir del 8º día de la enfermedad, las leptospiras son destruidas en el torrente sanguíneo por la actividad beta-macroglobulina en conjunto con lisozima, complemento (8, 151), así como por anticuerpos circulantes opsonizando leptospiras y causando el cese de la bacteremia (146).

La acción hemolítica asociada a determinadas serovariedades de leptospiras varía de acuerdo con el grado de hemólisis, instaurándose el siguiente cuadro patológico:

La anemia es iniciada por la acción de las hemolisinas sobre los eritrocitos de animales susceptibles y posteriormente por anticuerpos hemoaglutinantes producidos por el hospedador; causando anemia por hemólisis intravascular; algunas serovariedades patógenas producen hemólisis y otras serovariedades no (35, 124). Las aglutininas del Isotipo Ig M, puede también contribuir a una hemólisis intravascular por eritrocitos sensitivos (150, 151).

Hay una hemolisina producida por las cepas de los serogrupos : Autumnalis, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona, siendo las responsables de la hemoglobinuria en vacas jóvenes.

La ictericia es una manifestación común de la leptospirosis aguda y resulta de una hemólisis intravascular y del daño hepatocelular causado por algunas serovariedades como *icterohaemorrhagiae*, afecta a los perros causándoles una marcada necrosis hepática y disociación de los cordones de las células hepáticas; sin embargo hay serovariedades que se localizan y proliferan en el parénquima hepático sin causarles mucho daño ( 150, 151 ).

La nefritis ocurre en todas las infecciones por leptospiras las cuales entran al riñón por vía sanguínea, penetrando el endotelio vascular y llegando hasta el lumen del túbulo contorneado proximal, donde se multiplican y son eliminadas en la orina (4, 124, 135, 151).

La localización inicial en la corteza renal, causa una nefritis intersticial caracterizada por atrofia de las nefronas, infiltración de células mononucleares y fibrosis intersticial (124).

La insuficiencia renal es resultado de daño tubular y es común observar leptospiras en la luz tubular (4, 137).

La principal causa de la lesión tubular parece ser algún efecto tóxico directo de las leptospiros. Pueden verse cambios inflamatorios en los riñones, en los estadios tardíos del desarrollo de la lesión renal y por lo menos en un caso se asociaron con complejos inmunes circulantes y depósitos de componentes del complemento así como cuerpos electrodensos en los glomerulos, sugiriendo una glomerulonefritis por complejos inmunes (86).

La hipovolemia e hipotensión, son causadas por pérdidas de volumen intravascular como resultados de daño endotelial, contribuyendo al desarrollo de insuficiencia renal (135).

La penetración de la placenta puede ocurrir en animales gestantes con multiplicación de mesénquima o tejido cotiledonario fetal. El microorganismo eventualmente se dirige al feto y se multiplica dentro de su sistema sanguíneo; resultando en la muerte fetal y/o reabsorción con la consecuencia de que la madre puede abortar o producir mortinatos. La infección en la placenta durante el último tercio de gestación, puede estimular a la producción de anticuerpos específicos en el feto; siendo este capaz de sobrevivir a la invasión por leptospiros (151).

La producción de anticuerpos empieza en pocos días después de iniciar la leptospiremia y estimula rápidamente la compensación del organismo desde la sangre y tejidos. Hay algunos sitios inmunológicamente privilegiados para la

persistencia del microorganismo debido al nivel bajo de anticuerpos séricos presentes, como es el caso de los túbulos renales, ojo y útero (150, 151).

Divers (1992), encontró un caso de disfunción renal, asociada con *L. interrogans* en un semental de raza pura sangre de 7 años de edad observando: pirexia, leucositosis (7,8000 - 18,900 cels./ $\mu$ l), 4% de neutrófilos inmaduros y creatinina elevada (1.8 - 2.8 mg/dl); en orina una gravedad específica de 1.022, piouria (25 a 40 glóbulos blancos por campo), trazas de proteinuria y glucosuria. Con el ultrasonido (3-Mhz) se detectó aumento en el tamaño del riñón (13 cm de amplitud en ambos riñones). Encontrando anticuerpos fluorescentes en la orina para las serovariedades *pomona*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Por AM fueron 1: 12,800 para *L. pomona*, *icterohaemorrhagiae* y *grippotyphosa*, 1: 400 para *hardjo* y 1: 3200 para *canicola* (39).

La persistencia de piouria, fue compatible con infecciones del tracto urinario de equino con las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter spp.* (24); sin embargo la piouria ha sido reportada en humanos con fallas renales causadas por leptospirosis (25, 31).

Las evidencias circunstanciales de ictericia y disfunción hepática han sido asociadas con infección de leptospirosis en caballos (48, 141, 142).

De 3 caballos adultos con evidencia de ictericia se recolectaron, en una examinación post-mortem, sueros y muestras de órganos como el riñón, hígado y pulmón, aislando 4 serogrupos diferentes: Australis (*bratislava*), Pomona (*pomona*), Icterohaemorrhagiae y Ballum (*arborea*) (48).

### DIAGNÓSTICO.

El aislamiento de leptospiras puede realizarse durante la etapa aguda de la enfermedad por cultivo de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo en medios como: Fletcher, Stuart o el EMJH (Ellinghausen, Mc Culloug, Johnson y Harris)(45), los cultivos se incuban a 30°C o a temperatura ambiente en la obscuridad y se descartan si son negativos después de 6 a 8 semanas de incubación (27, 105).

Sin embargo es difícil el desarrollo de ésta bacteria en medios de cultivo artificiales (146).

La dificultad del cultivo de leptospiras varía según la serovariedad, por ejemplo: el desarrollo de *bratislava* puede obtenerse hasta después de 6 meses (65).

Para mantener la viabilidad de las leptospiras en tejidos o fluidos corporales hay que mantenerlas a 4°C o colocarlos inmediatamente en un 1% de albúmina sérica bovina (ASB) en una dilución 1:10 (121, 133).

Para la colección de muestras de orina pueden usarse diuréticos, como la furosemida (18, 107).

El examen microscópico de campo oscuro puede revelar la presencia de leptospiras en orina y sangre. Esto es valioso para establecer un diagnóstico rápido pero no se recomienda como procedimiento único, porque los artefactos, detritus celulares y fibrillas se confunden a menudo con espiroquetas (27, 164).

Las técnicas de tinción Giemsa y argéntica; se han usado como procedimientos para demostrar organismos en tejidos post- mortem y son particularmente útiles si las pruebas serológicas y de cultivo no son posibles (65).

Las secciones de hígado y riñón en casos severos, así como fétos abortados de bovino son teñidas por la técnica de impregnación de Levaditi o Bridges y Luna (54, 55, 56).

Una de las técnicas que ha mejorado la facultad de identificar a las leptospiras en tejidos y fluidos es la técnica de inmunofluorescencia que permiten la observación específica del microorganismo sobre tejidos (121).

Debido a las dificultades para el diagnóstico en la observación directa y en el cultivo de leptospiras se ha considerado a la aglutinación microscópica (AM) como prueba de referencia (18, 26, 27). En esta prueba se utilizan cultivos jóvenes de leptospiras en medios líquidos para usarse como antígenos, ya sea vivos o tratados con formol.

Los sueros se diluyen seriadamente con solución amortiguadora de fosfatos (SAF), para dar diluciones de 1: 50 hasta 1: 6400 o más, considerando como títulos positivos a partir de 1:100 o superiores (65, 105).

Los títulos pareados son más útiles que títulos simples; un aumento o disminución de las diluciones dobles, pueden indicar una infección aguda o reciente (144).

Sin embargo, la AM es laboriosa, no diferencia títulos de anticuerpos en animales vacunados de los de una infección natural, al igual ocurren reacciones cruzadas entre serovariedades y no es posible identificar, infecciones latentes (65, 146, 166).

Se ha reportado el aislamiento de leptospiras en orina y riñón de bovinos y cerdos con la ausencia de seropositividad en la AM (18, 47, 50, 60).

Las pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA), son más sensitivas que la AM, detectando individuos que están en la fase de leptospiremia que no pueden ser identificados por AM (147, 150, 153).

Las pruebas de ELISA pueden adaptarse para detectar anticuerpos específicos para leptospiras IgM o IgG, diferenciando una enfermedad aguda de una crónica. También identifica IgM en enfermedades agudas y negativas a AM, debido a que las IgM aglutinantes aparecen después de la 1a. semana de enfermedad, pero su concentración disminuye rápidamente en varias semanas hasta alcanzar niveles bajos, de tal manera que pueda resultar una medición inadecuada del estado inmunológico del animal así como proporcionar titulaciones difíciles de interpretar (18, 145).

La clase IgG, son anticuerpos protectores que se desarrollan con mayor lentitud que las IgM y están presentes más tiempo (3, 40).

Con la finalidad de purificar cultivos, así como aislar leptospiras de muestras clínicas, se puede recurrir a la inoculación de animales de experimentación como son los hamsters y cobayos jóvenes que se prefieren por su mayor susceptibilidad a la infección (27).

El material se inocula intraperitonealmente, posteriormente se colecta sangre cardiaca para cultivo, en 4o. y 6o. días después de la inoculación, cuando aparecen los primeros signos de la enfermedad.

Generalmente la primera manifestación de leptospirosis es fiebre (39 - 41° C), ictericia y la muerte pueden presentarse 6 a 14 días después de la exposición. Otros investigadores han observado la pérdida de peso corporal como evidencia de la infección por leptospirosis. Sin embargo algunas cepas no producen signos clínicos aunque los animales estén infectados (28, 91, 98).

Han surgido nuevas técnicas que mejoran la identificación y clasificación taxonómica de leptospirosis como son la hibridación de ácidos nucleicos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR o RCP) (120, 140, 148).

Entre las técnicas de hibridación, la hibridación *in situ* para detectar *L. interrogans*, se basa en el uso de una sonda de ADN de éste microorganismo marcada con biotina, que se pone en contacto con una impronta de tejido o fluido sospechoso. Si el microorganismo se encuentra presente su ADN hibrida con el de la sonda, pudiéndose observar al microscopio leptospirosis teñidas de azul al enfrentar estas a un sustrato como el nitro-azul tetrazolio (NBT) y el bromocloro-indolil-fosfato (BCIP) (57).

El PCR o RCP se usa como técnica de diagnóstico en enfermedades infecciosas causadas por microorganismos de lento y dificultoso crecimiento. Estudios han revelado que la técnica puede detectar por lo menos 10 copias del genoma de leptospira y su sensibilidad es de 10 a 50 veces mayor que el método de hibridación de ADN (44, 143).

El PCR, es una técnica que evalúa, muestras de sangre positiva a los 2 días post-infección, siendo una ventaja para el diagnóstico temprano comparando con los 7 días post-infección que se detectan con AM (140).

En México, se han desarrollado recientemente sondas de ADN con *L. icterohaemorrhagiae* que han sido empleadas para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos mediante hibridación en nylon ( Dot-blot ) e *in situ* con muestras de orina de animales serológicamente positivos. (36, 57, 106)

## TRATAMIENTO.

Las recomendaciones para la terapia con antimicrobianos en equinos son extrapoladas a partir de otras especies (53, 79, 130, 133, 137, 162). Oxitetraciclina (5 - 10 mg/kg de peso), estreptomycin (10 - 20 mg/kg de peso) y penicilina (20,000 a 30, 000 U I/kg de peso) son tratamientos recomendados por un período de por lo menos 2 semanas (11, 20, 30, 38).

La penicilina G potásica (20 millones de UI, IV cada 6 hrs) ha sido usado en yeguas gestantes con títulos de anticuerpos contra leptospira, con una avanzada gestación, naciendo de ellas potros sanos (12).

El ácido clavulánico- ticarcilina (40 mg/Kg de peso IV cada 8 hrs.) ha sido usado con éxito en el tratamiento de leptospirosis renal en equinos (39).

Para el tratamiento de uveitis recurrente (URE) se usan los corticosteroides, administrados en forma tópica, subconjuntival o sistémica (119).

La administración de 10 a 40 mg de acetato de metilprednisolona, en un volumen de 0.5 a 1.0 ml, durante 4 semanas, da resultados de corta duración (24 a 48 hrs.), la inyección subconjuntival de triamcilon, 3 a 6 mg en un volumen de 0.5 a 1.0 ml, otorga un efecto intermedio (3 a 7 días) pero se ha reportado como causa de laminitis (119).

En el caso de uveitis severa, se puede administrar dexametasona (20 mg IM, 2 veces al día) por 5 días (119). Debido a los efectos colaterales que producen (úlceras corneales y queratitis micótica equina), el uso de corcosteroides es limitado (1, 62, 104).

En el caso de uveitis leves o moderadas, el uso de agentes antiinflamatorios no esteroides son útiles en el tratamiento de URE, como la fenilbutazona administrada oral o intravenosa a una dosis de 1 - 4 gr /equino/ día (62).

El meglumina de flunixin es de elección para el tratamiento de uveitis moderada a severa de 0.25 - 1mg/kg oral, IV, IM; esta administración varía con base en la respuesta clínica o experiencia del clínico; Schwink (1994), recomienda 0.25 mg/Kg IV 2 veces al día durante 3 a 7 días. El meglumina de Flunixin ha sido usado subconjuntivalmente pero esta ruta no es generalmente recomendable, porque es irritante (29).

Se ha utilizado la aspirina (15 mg/kg 2 veces al día, oral) en el caso de uveitis recurrente crónica. Los posibles efectos colaterales de las drogas anti prostaglandínicas incluyen úlceras gástricas y posible disfunción renal (119).

Cada caballo con uveitis debe ser tratado con agentes midriáticos y ciclopléjicos parasimpaticolíticos; para aliviar el dolor que causa los espasmos musculares del iris y cuerpo ciliar, así como disminuir el contacto iris-cristalino, minimizando el riesgo de seclusión pupilar por una sinequia posterior; también reducir la congestión, provocando una disminución en la salida de proteínas y células de la vasculatura del iris, observándose escasa turbidez del humor acuoso (104, 105).

La midriasis también permite mejorar la visión durante el episodio de uveitis, por lo que se indica la administración tópica de atropina al 1 a 4 % en solución o ungüento, la frecuencia en la administración varía de acuerdo a la

severidad del caso ; para lograr una midriasis moderada y mantener este estado, se sugiere la administración de atropina tópica (1 - 3 %), cada 6 hrs, hasta que ocurra la midriasis. Una vez sucedido esto, la midriasis se puede mantener mediante una administración menos frecuente, por ejemplo cada 12 hrs (102, 125).

El tracto uveal inflamado es muy resistente a los efectos de la atropina; si la midriasis es lenta o incompleta se puede administrar clorhidrato de fenilefrina al 10% o dar una combinación de metilescopolamina-fenilefrina (88, 119).

### CONTROL.

Debido a la susceptibilidad de leptospira a la desecación, a la variación del pH y otros factores medio ambientales, la leptospirosis debería ser una enfermedad fácil de controlar o erradicar, sin embargo su control es difícil (89).

Ocurren infecciones cruzadas entre diferentes especies animales, o bien estos animales sufrieron leptospirosis y son sólo inmunes a la cepa que produjo la infección siendo susceptibles a otras cepas no relacionadas antigénicamente.

Otra de las causas son las infecciones subclínicas, que son manifestaciones de leptospirosis que en la mayoría de los casos pasan inadvertidas y que tienden a la cronicidad pudiendo prolongar el estado de portador por más tiempo. Por esta

razón se debe realizar pruebas serológicas regularmente en busca de nuevas infecciones, así como tratar a los animales con infección clínica mediante el uso de antimicrobianos, además del aislamiento del animal infectado. Es muy importante controlar las fuentes de infección como son el agua estancada, el contacto con excretas de otras especies animales y el combate de los roedores (3, 11, 37, 59).

La vacunación es un método efectivo para controlar la leptospirosis. Esta se debería realizar anualmente en explotaciones intensivas o cada 4 o 6 meses en explotaciones extensivas dependiendo del grado de exposición (64, 65, 72).

El control de la leptospirosis en otras especies ha sido efectivo debido al uso de vacunas multivalentes, no se han aprobado vacunas en equinos; según Bernad (1993), el uso de vacunas de bovinos en equinos puede resultar en una reacción anafiláctica, debido a la presencia de albúmina sérica bovina (ASB), presente en las vacunas (11).

Una alternativa para la prevención ha sido el desarrollo de vacunas con ingeniería genética, ofreciendo vacunas específicas, inocuas y eficaces (14, 152).

Estas nuevas vacunas ofrecen niveles de anticuerpos altos, para todas las edades, además de permitirnos diferenciar entre animales vacunados e infectados

naturalmente. Esta nueva tecnología puede ser aplicada a otras enfermedades como es el caso de la leptospirosis.



## **HIPÓTESIS**

**La presentación de casos de uveítis recurrente así como nefritis intersticial, en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes puede asociarse a la presencia de anticuerpos aglutinantes antileptospira.**

## **OBJETIVOS**

**Evaluar la seroprevalencia de leptospira en una población de 106 equinos de la Sección Veterinaria del Instituto Nacional de Higiene (I.N.H.), ubicadas en Tecámac, Edo. de México, dedicados a la producción de sueros hiperinmunes.**

**Relacionar las posibles lesiones renales, hepáticas u oculares con los títulos observados en la AM.**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se sangraron 106 equinos de la Sección Veterinaria del I.N.H., utilizados para la producción de sueros hiperinmunes contra: veneno de alacrán (Centuroides), virus rábico, toxina tétanica, toxina diftérica y veneno de serpientes (cascabel y nauyaca); los animales fueron procedente del criadero 2 de la Secretaria de la Defensa Nacional, del Edo. de Chihuahua y del agrupamiento de caballos de la Secretaria de Seguridad Pública del D.F.

La colección de sueros fue lotificada de acuerdo a los grupos de inmunización preestablecidos y se consideró como grupo control animales no inmunizados, la mayoría burros.

Se colectaron 8 ml de sangre sin anticoagulante que posteriormente se enviaron en refrigeración al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde los tubos fueron centrifugados a 2500 r.p.m. durante 5 min. recolectándose el suero en tubos estériles para su conservación en congelación hasta su uso.

Se usaron 19 antígenos de 4 a 7 días de desarrollo en medio líquido de Stuart para la prueba de aglutinación microscópica, diluyendo en solución amortiguadora de fosfatos (SAF), a contener aproximadamente de 100 a 200

microorganismos por campo (100 X). La prueba de aglutinación microscópica se realizó según describe Myers (105).

Los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente e inactivados en baño María a 56°C, durante 30 min., se prepararon diluciones 1:25 mezclando en un tubo de ensayo 0.2 ml de suero con 4.8 ml de SAF, (pH 7.2 a 7.4). La prueba se desarrolló en microplacas de 96 pozos de fondo plano colocando 0.05 ml de la dilución a cada uno de 20 pozos y se les agregó 0.05 ml del antígeno correspondiente, con lo que se obtuvo una dilución inicial de 1:50. Un pozo se utilizó como control mezclando 0.05 ml de antígeno y 0.05 ml de SAF. Las serovariedades utilizadas se enlistan en la Tabla 2. Hecha la mezcla las placas se incubaron durante 2 hrs. a temperatura ambiente y las aglutinaciones se leyeron en el microscopio de campo obscuro con el objetivo 10X corto<sup>1</sup> y un condensador de campo obscuro seco<sup>2</sup>, en un microscopio Zeiss West Germany 473415. La interpretación de la aglutinación de cada antígeno con el pozo control se hizo según describe Myers (105).

Negativo: sin aglutinación e idéntico al pozo control.

1+: aglutinación con 75% de células libres.

2+: aglutinación con 50% de células libres.

---

(1) 160/-L10/0.22 P UTI 6/0 34 Leitz Wezlar Germany 559121.

(2) 466300- 9901 (0.85/0.9), Carl Zeiss.

3+: aglutinación con 25% de células libres.

4+: aglutinación con 0- 25% de células libres.

Se seleccionaron todos los sueros positivos a 2+ o más, haciendo diluciones dobles de la dilución original hasta la dilución 1: 6400 y se determinó el título, sueros que alcanzaron 1:6400 fueron subsecuentemente analizados a una mayor dilución. Se consideraron positivos sueros con reacciones a partir de la dilución 1: 100.

#### **PRUEBAS DE INMUNODIFUSION.**

Para verificar si hubo una reacción cruzada entre los antígenos que se ocupan para la producción de sueros hiperinmunes y las leptospiras; se utilizaron pruebas de inmunodifusión enfrentandolos a sueros con títulos de 1: 400 o mayor.

#### **PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE DE LEPTOSPIRA.**

Se inocularon 4 tubos de 5 ml de medio Stuart con 0.3 ml de cultivos de leptospiras de 5- 7 días, usando las serovariedades cuyos títulos de anticuerpos alcanzaron 1: 400 o superiores: *australis*, *autumnalis*, *baltum*, *bratislava*, *celledoni*, *cynopteri*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *paidian*, *pomona*, *pyrogenes*, *wolffii*, y *tarassovi*.

**TABLA 2.** Lista de serovariedades de *Leptospira* spp. patógenas utilizadas como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica.

Serovariedad	Cepa	Serogrupo	Num	Especie
<i>australis</i>	Ballico	Australis	1	<i>L. interrogans</i>
<i>bratislava</i>	Jez-Betislava	Australis	1	<i>L. interrogans</i>
<i>autumnalis</i>	Akiyami-A	Autumnalis	2	<i>L. borgpeterseni</i>
<i>castellonis</i>	Castellon-3	Ballum	3	<i>L. interrogans</i>
<i>bataviae</i>	Van-Fienen	Bataviae	4	<i>L. interrogans</i>
<i>paidjan</i>	Paidjan	Bataviae	4	<i>L. interrogans</i>
<i>canicola</i>	Hond-Utrecht IV	Canicola	5	<i>L. interrogans</i>
<i>celledoni</i>	Celledoni	Celledoni	6	<i>L. weilii</i>
<i>cynopteri</i>	3522C	Cynopteri	7	<i>L. kirshneri</i>
<i>grippotyphosa</i>	Moskva V	Grippotyphosa	8	<i>L. interrogans</i>
<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	10	<i>L. interrogans</i>
<i>icterohaemorrhagiae</i>	RG4	Icterohaemorrhagiae	11	<i>L. interrogans</i>
<i>pomona</i>	Pomona	Pomona	18	<i>L. interrogans</i>
<i>pyrogenes</i>	Salinim	Pyrogenes	19	<i>L. interrogans</i>
<i>hardjo</i>	Hardjo-prajitno	Sejroe	22	<i>L. interrogans</i>
<i>sejroe</i>	M-84	Sejroe	22	<i>L. interrogans</i>
<i>wolffi</i>	3705	Sejroe	22	<i>L. interrogans</i>
<i>szwajizak</i>	Szwajizak	Mini	16	<i>L. interrogans</i>
<i>szwajizak</i>	Oregon	Mini	16	<i>L. santarosai</i>
<i>tarassovi</i>	Perepelitsin	Tarassovi	24	<i>L. borgpetersenii</i>

Obtenidas del Centro Panamericano de Zoonosis Bs.Arg.

Clasificación actualizada del Instituto Pasteur:

<http://www.pasteur.fr/Bio/Leptospira/Interrogans.html>

Los cultivos se centrifugaron a 15, 000 x g por 15 min<sup>1</sup>, al sedimento se le agregaron 5 ml de SAF, se lavaron y centrifugaron nuevamente. El sedimento fue resuspendido en 1.5 ml de agua destilada estéril (pH 7) y con la finalidad de romper las células, estas se congelaron a -62° C por 2 hrs. y se descongelaron a temperatura ambiente por 8 veces, sometiénolas posteriormente a vibración sónica<sup>2</sup> con una fuerza de 40 y tono de 4 por 10 min. Se examinaron por microscopía de campo oscuro asegurándose de la completa desintegración y se cuantificó el contenido de proteínas por el método Biuret (52).

#### INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD).

Técnica simple también llamada análisis de Ouchterlony o difusión doble en agar; se basa en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunde en forma radial a través de un medio semisólido y forman precipitados de complejos inmunes al alcanzar una concentración equivalente siendo analizados visualmente (78, 112, 139). Identifica sistemas antígeno-anticuerpo múltiples, establece la posible relación inmunológica entre 2 antígenos y hace estimaciones sobre la pureza del anticuerpo (58, 112, 123).

---

1 BECKMAN Model J2-21: centrifuge.

2 BRONWILL BIOSONIC: Power (40), Tune (3-4).

Se preparó el agar noble al 1% (Apéndice I), disolviendo en 100 ml de agua bidestilada, se calentó la solución, hasta observar el color del medio transparente, se vació en cajas de Petri con 0.5 mm de espesor; ya solidificado se perforaron los pozos en el agar con un sacabocados, se sellaron con una gota de agar caliente hasta la mitad para evitar la comunicación entre los pozos.

En el pozo central se agregó suero sin diluir y en los pozos periféricos, los diferentes antígenos en el estudio (Tabla 3) y antígeno soluble de leptospiras; se incubó a temperatura ambiente y después de las 72 hrs. se lavaron con SSF para posteriormente hacer las lecturas correspondientes.

#### CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF).

Técnica también conocida como inmunoelectroforesis por contracorriente, electroprecipitación, electrosíneresis, inmunoforesis y electroinmunodifusión unidimensional doble, permite que el antígeno y el anticuerpo migren libremente y precipiten al ponerse en contacto. La probabilidad de que ambos migren simultáneamente y en sentido contrario, es mediante la aplicación de un campo eléctrico, apareciendo en forma rápida las bandas de precipitación (32, 52, 139). Los antígenos y sus anticuerpos se colocan cada uno en pozos perforados en la agarosa, son entonces sometidos a la acción de un campo eléctrico en una solución buffer con un pH de 8.2-8.6 (32, 52, 139).

En estas condiciones, la mayoría de los anticuerpos no tienen carga neta, por lo que no se desplazan bajo la influencia del campo eléctrico, sin embargo pueden ser arrastrados por reoforesis (78, 139). Esta se refiere al movimiento de los iones que se produce cuando en la agarosa se aplica un campo eléctrico, bajo condiciones de pH 8.2-8.6. Los cationes libres del sistema migran hacia el electrodo negativo arrastrando a las macromoléculas carentes de carga (anticuerpos). Los antígenos con carga negativa, migran hacia el electrodo con carga positiva y al encontrarse con sus anticuerpos, forman las bandas de precipitación; este método es aplicable para antígenos con cargas negativas a valores de pH entre 8.0- 8.8. (52, 58, 73).

Se preparó agarosa con SAF-TRIS - ácido acético al 0.3% (Apéndice 1), calentando hasta observar la solución transparente. Posteriormente se vertieron 4 ml en un portaobjetos, se dejó enfriar y se perforaron 2 filas de pozos, en los que se agregaron sueros en la fila izquierda y en la derecha los antígenos respectivos (Tabla 3), o leptospiras. Se colocó el portaobjetos en la cámara de electroforesis, quedando el pozo con el antígeno del lado cercano al polo negativo y el pozo con suero del lado cercano al polo positivo. Se preparó la cámara húmeda<sup>1</sup> con SAF-Tris ácido-acético, se puso un trozo de tela absorbente en cada lado del portaobjetos, de tal manera que las partes laterales quedarán sumergidas en la

solución (157). Se tapó la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente del poder aplicando 400 milivolts por 30 min. de prerecorrido para el suero y transcurrido el tiempo, se colocó el antígeno dejando correr 1 ½ hrs. con el mismo voltaje. Se observaron las líneas de precipitación y posteriormente se sumergió en SSF y se realizó la lectura correspondiente después de las 24 hrs.

<b>TABLA 3. Antígenos usados para la obtención de sueros hiperinmunes</b>
- <b>Toxoides tetánico:</b> 23 Lf / ml en SSF
- <b>Toxoides diftérico:</b> 2, 000 Lf /ml en solución de cloruro de calcio 0.5%
- <b>Viperino:</b> 8/16 DL <sub>50</sub> /ml venenos de víbora Cascabel/Nauyaca ( <i>Crotalus baciliscus/ Bothrops aspers</i> ).
- <b>Alacrán:</b> veneno de alacrán ( <i>Centruroides spp</i> ) 50 DL <sub>50</sub> /ml en solución de hidróxido de aluminio al 0.3% en SSF.
- <b>Rabia I, II:</b> Vacuna elaborada por la Secretaría de Salud (tejido nervioso de ratón lactante infectado con 3 cepas de virus rábico (CVS cepa Pasteur, 52/123 aislada de cerebro canino y 91/122 aislada de cerebro humano) 10 <sup>7</sup> partículas /ml inactivados con luz ultravioleta 0.025 timerosal ml, 0.0001 Fenol en solución acuosa / ml)
- <b>Rabiffa III, IV:</b> Virus rábico cepa PV- 11- PM (ongen Pasteur), cultivado en línea celular estable y (NIL- 2) inactivado con betapropiolactona con 10 <sup>7</sup> partículas /ml.

S.S.F.= Solución salina fisiológica

Lf= Unidades Lcofilizables

DL<sub>50</sub>= Dosis letal 50 %

### INMUNIZACIÓN EN CONEJOS.

Con el fin de descartar reacciones cruzadas, se inocularon también 5 conejos con los antígenos utilizados para inmunizar a los equinos (Tabla 3). Al inicio de la prueba se sangraron para detectar anticuerpos específicos contra leptospiras. Los antígenos se inocularon en dosis de 0.5 ml por vía subcutánea cada 7 días por un lapso de un mes. Después de 4 días de la última inmunización, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para desafiar estos sueros contra leptospiras por AM (106).

### LESIONES EN LOS EQUINOS.

Necropsias de los equinos muertos durante un periodo de 1 año posterior a la colecta inicial de sueros, fueron realizadas por el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal SARH, Tecamac, Edo. de México, y las lesiones observadas fueron correlacionadas con los resultados de AM.

## RESULTADOS

La prueba de AM detectó anticuerpos contra leptospira en 83.9% de los equinos muestreados (89 de 106); resultando seropositivos ( $\geq 1: 100$ ) por lo menos a una serovariedad (Tabla 4).

Las serovariedades que con más frecuencia se detectaron fueron: *autumnalis* (33%), *australis* (28.3%), *pomona* (24.5%), *icterohaemorrhagiae* (23.5%), *hardjo* (19.8%), *pyrogenes* (17.9%) y *bratislava* (16.9%) (Tabla 5).

Con respecto a las serovariedades con títulos más altos con 1: 6400 encontramos: *autumnalis*, *pyrogenes* y *cynopteri* (2.8 %); con títulos de 1: 3200 *australis*, *celledoni*, *szwajizak* e *icterohaemorrhagiae* (9.4 %).

Sueros de 62 equinos resultaron positivos a 2 o más serovariedades y uno de ellos reacciona hasta contra 10 serovariedades ( Apéndice II ).

Después de la extracción proteica de los cultivos de leptospiras, se obtuvieron de 0.2 a 0.5 mg/ml de proteína según el método de Biuret.

Con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de IDD y CIEF, los antisueros de los equinos inmunizados contra difteria, alacrán, viperino y tétanos, dieron líneas muy densas de precipitación estrecha en ambas pruebas sólo con sus antígenos homólogos pues fueron negativos contra rabia y leptospiras. Sólo hubo un caso en IDD en el cual se observó una reacción de identidad total para el suero

del equino 545 entre rabia III, IV-*pomona*. (Figura 2). En las demás serovariedades de leptospiras no se encontraron líneas de precipitación en IDD.

En el caso de los sueros de conejos obtenidos antes y después de su calendario de inmunización, en las pruebas de AM, no se encontraron reacciones positivas en las diluciones 1:50, contra ninguna de las 14 serovariedades probadas. En la IDD, contra los antígenos utilizados para inmunizar a los equinos, sí se encontraron líneas de precipitación en estos conejos.

Después de 12 meses de sangrado inicial 59 equinos murieron 55.6% a consecuencia de lesiones diversas entre las que destacan hepatopatías, nefropatías, enteritis hemorrágicas y congestión pulmonar (Tabla 7). El grupo difteria mostró un mayor porcentaje de mortalidad con 66.6 %, seguido por los grupos viperinos 64.5 %, tétanos 60.8 %, Alacrán 55.5 %, rabia 47.6 % y en el grupo control el 50 % (Tabla 7); solo un equino mostró uveítis recurrente en el mismo período.

Se encontraron 9 de los 59 animales con lesiones posibles de leptospirosis y con títulos de anticuerpos  $\geq 1:400$  en la AM (15.2%); 12 animales más (20.3%) mostrarán títulos de anticuerpos similares pero no se tiene una relación de lesiones dado que a la necropsia se observaron avanzados cambios post-mortem o bien no se realizó la necropsia.

Entre los animales con títulos de anticuerpos inferiores a 1:400, 14 de ellos (23.7%) mostraron alguna lesión coincidente con leptospirosis y de 24 equinos más (40.6%) no se obtuvo reporte de lesiones por las razones anteriormente expuestas.

**Tabla 4. Animales positivos en la prueba de aglutinación microscópica (n = 106) contra leptospirosis.**

Título de anticuerpos.	Num. de animales.	%
1: 100	89	83.9
1: 200	67	63.2
1: 400	48	45.2
1: 800	22	20.7
1:1600	14	13.2
1:3200	10	9.4
1:6400	3	2.8

**Tabla 6. Serovariedades con títulos más altos**

<b>1: 6400</b>	<i>autumnalis</i> <i>pyrogenes</i> <i>cynopteri</i>
<b>1: 3200</b>	<i>australis</i> <i>celledoni</i> <i>szwajizak</i> <i>icterohaemorrhagiae</i>

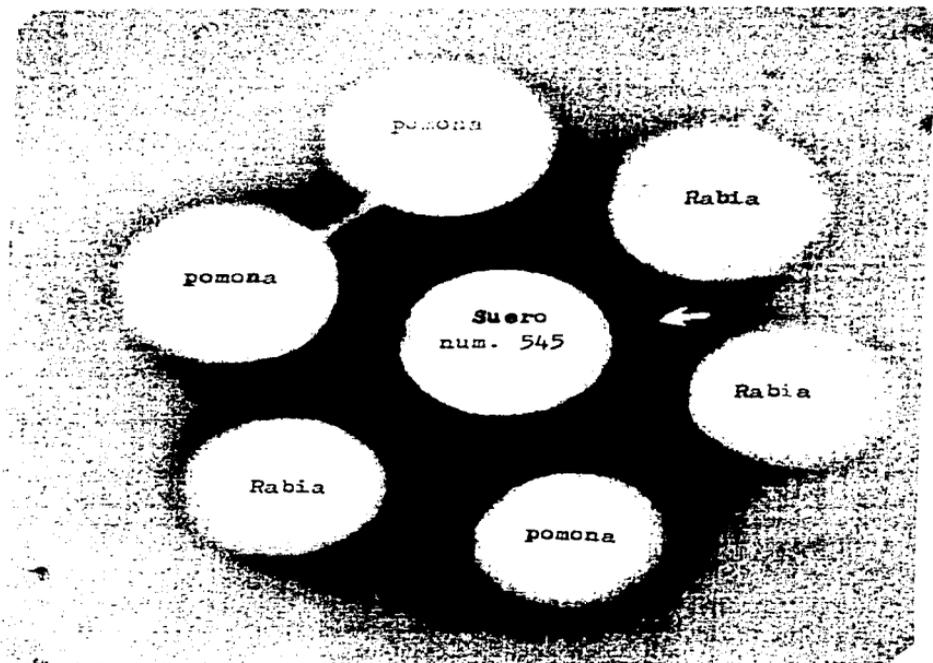


Figura 2. Reacción de identidad total para el suero del equino 545 entre rabia  
III,IV-pomona.

Tabla 5. Número de recciones positivas de AM detectadas en cada grupo contra las diferentes serovariedades.

GRUPO	Alacrán	Difteria	Rabia	Tétanos	Viperino	Control	Totales
# animales.	9	12	21	23	35	6	106
Positivos	8 (88.8%)	10 (83.3%)	16 (76.1%)	18 (78.2%)	32 (91.4%)	5 (83.3%)	89 (83.9%)
<i>australis</i>	2 (22.2%)	2 (16.6%)	10 (47.6%)	1 (4.3%)	15 (42.8%)	0	30 (28.3%)
<i>autumnalis</i>	3 (33.3%)	5 (41.6%)	2 (9.5%)	9 (39.1%)	13 (37.1%)	3 (50%)	35 (33%)
<i>ballum</i>	3 (33.3%)	2 (16.6%)	0	6 (26%)	4 (11.4%)	2 (33.3%)	17 (16%)
<i>bataviae</i>	2 (22.2%)	0	1 (4.7%)	2 (8.6%)	4 (11.4%)	4 (66.6%)	13 (12.2%)
<i>bratislava</i>	2 (22.2%)	2 (16.6%)	5 (23.8%)	5 (21.7%)	4 (11.4%)	0	18 (16.9%)
<i>canicola</i>	0	1 (8.3%)	0	0	0	0	1 (9.4%)
<i>celledoni</i>	0	0	2 (9.5%)	3 (13%)	0	1 (16.6%)	6 (5.6%)
<i>cynopteri</i>	1 (11.1%)	1 (8.3%)	6 (28.5%)	2 (8.6%)	1 (2.8%)	0	11 (10.3%)
<i>grippotyphosa</i>	0	1 (8.3%)	0	0	1 (2.8%)	0	2 (1.8%)
<i>hardjo</i>	2 (22.2%)	6 (50%)	0	5 (21.7%)	8 (22.8%)	0	21 (19.8%)
<i>hebdomadis</i>	0	1 (8.3%)	1 (4.7%)	0	1 (2.8%)	0	3 (2.8%)
<i>icterohaemorrha.</i>	2 (22.2%)	2 (16.6%)	6 (28.5%)	2 (8.6%)	12 (34.2%)	2 (33.3%)	25 (23.5%)
<i>paidjan</i>	1 (11.1%)	0	1 (4.7%)	0	1 (2.8%)	0	3 (2.8%)
<i>pomona</i>	6 (66.6%)	1 (8.3%)	2 (9.5%)	6 (26%)	11 (31.4%)	0	26 (24.5%)
<i>pyrogenes</i>	0	2 (16.6%)	4 (19%)	7 (30.4%)	6 (17.1%)	0	19 (17.9%)
<i>sejroe</i>	0	0	0	0	1 (2.8%)	0	1 (9.4%)
<i>szwajczak</i>	0	0	3 (14.2%)	3 (13%)	1 (2.8%)	0	7 (6.6%)
<i>wolffi</i>	0	1 (8.3%)	0	0	2 (5.7%)	0	3 (2.8%)
<i>tarassovi</i>	0	0	1 (4.7%)	0	2 (5.7%)	0	3 (2.8%)

**Tabla 7. Resultados de las necropsias y estudios histopatológicos de algunos de los animales que murieron en el periodo de 12 meses posteriores al sangrado inicial.**

TABLA 7. GRUPO: ALACRAN n=9 Mortalidad 55.5%			
#	Necropsia	Histopatología	AM
56	S/D	S/D	1: 100 <i>pomona</i>
84	S/D	S/D	1: 100 <i>braislava</i>
101	Congestión pulmonar unilateral aguda severa.	S/D	1: 100 <i>pomona</i> 1: 200 <i>australis autumnalis</i>
518	S/D	Nefritis supurativa, embólica con abundantes bacterias y necrosis focal. Hepatitis supurativa portal leve. Congestión pulmonar.	1: 400 <i>ballum</i> .
521	S/D	S/D	1: 100 <i>icterohaemorrhagiae</i> . 1: 200 <i>paidjan pomona</i>

**TABLA 7. GRUPO. DIFTERIA n= 12 Mortalidad 66.6%**

#	Necropsia	Histopatología	AM
526	Cambios post-mortem.	S/D	1: 200 <i>ballum, hardjo</i> 1: 400 <i>autumnalis</i>
527	Fístula perineal, Hepatomegalia congestiva, emaciación e hipertrofia cardíaca excéntrica.	Congestión pulmonar y hepatitis portal supurativa leve.	1: 200 <i>autumnalis</i>
528	S/D	S/D	1: 50 <i>australis, autumnalis, bataviae, bratislava, cynopteri, hardjo, pomona, tarassovi</i>
530	Hidrotórax, edema pulmonar, hidropericardio, hepatitis y nefropatías	Hepatitis portal no supurativa severa y metamorfosis grasa centrolobulillar, pleuritis fibrinosa leve y nefritis intersticial leve.	1: 100 <i>grippotyphosa</i> 1: 400 <i>hardjo</i> 1: 800 <i>wolffi</i>
532	Esplenomegalia moderada, hepatomegalia moderada y trombosis hepática severa	Hígado con espacios portales y con abundantes células mononucleares y polimorfonucleares	1: 100 <i>australis, autumnalis</i> 1: 200 <i>hardjo</i>
533	Bronconeumonía 40%, aneurisma venoso arterial de los vasos esplénicos, enteritis catarral moderado, tiflitis catarral leve, hidrotórax y nefropatías	Leucoencefalomalasia focal, esteatosis hepática centrolobulillar severa difusa, glomerulonefritis proliferativa, nefritis intersticial y bronconeumonía severa difusa.	1: 100 <i>autumnalis</i> 1: 200 <i>hardjo</i>
534	Cálculos de pelvis renal, enteritis hemorrágica severa y urolitiasis severa	Fibrosis renal severa, infiltración de células mononucleares y glomeruloesclerosis severa.	1: 100 <i>autumnalis</i>
535	S/D	Nefritis intersticial no supurativa focal, autólisis severa del hígado y metamorfosis grasa centrolobulillar, miositis hemorrágica y autólisis intestinal	1: 50 <i>autumnalis, bataviae, cynopteri bratislava, hardjo, pomona, pyrogenes tarassovi</i>

**TABLA 7. GRUPO: RABIA n= 21 Mortalidad 47.6%**

#	Necropsia	Histopatología	AM
76	Glomerulonefritis generalizada, tromboembolismo pulmonar mesentérico.	S / D	1: 50 <i>autumnalis, icterohaemorrhagiae</i>
539	S / D	S / D	1: 800 <i>australis</i> 1: 3200 <i>cynopteri</i>
540	Ascitis, pleuritis fibrinosa moderada, pericarditis fibrinosa leve, enteritis catarral multifocal, tiilitis catarral severa, colitis catarral multifocal e infartos renales.	Nefritis intersticial no supurativa focal crónica con fibrosis e infartos y enteritis hemorrágica severa.	1: 200 <i>bratislava</i> 1: 1600 <i>australis</i>
541	S / D	S / D	1: 100 <i>bratislava</i> 1: 800 <i>icterohaemorrhagiae</i> 1: 1600 <i>autumnalis</i>
542	S / D	S / D	1: 3200 <i>cynopteri</i>
543	Hepatopatías y trombosis hepática leve, nefropatía degenerativa, edema pulmonar en un 40% y colitis catarral moderada.	Leucoencefalomalasia	1: 800 <i>hardjo</i> 1: 6400 <i>cynopteri</i>
544	Encefalo con hemorragias subdural y epidural y cambios post-mortem.	S / D	1: 50 <i>australis</i> y <i>hardjo</i>
546	S / D	S / D	1: 50 <i>australis, autumnalis, grippophosa, hardjo icterohaemorrhagiae, pyrogenes y tarassovi</i>
547	Encefalomalasia, tiilitis y colitis hemorrágica, multiples hemorragias en corteza renal, enteritis catarral difusa y trombosis hepática leve.	Meningoencefalitis no supurativa severa con edema perivascular.	1: 50 <i>australis, bratislava, icterohaemorrhagiae, pyrogenes y tarassovi</i>
548	S / D	S / D	1: 100 <i>icterohaemorrhagiae</i>

TABLA 7. GRUPO: TETANOS n=23 Mortalidad 60.8%			
#	Necropsia	Histopatología	AM
501	Trombo en vena cava posterior, infartos renales multifocales, trombo en pulmón lóbulo cefálico izquierdo, colitis hemorrágica multifocal, miasis gástrica moderada ( <i>Gasterophilus spp</i> ) y tiflitis hemorrágica.	Nefritis intersticial leve	1: 100 <i>celledoni</i> y <i>pomona</i> 1: 200 <i>autumnalis</i>
502	S / D	S / D	1:100 <i>hardjo</i>
503	Trombosis en hígado, infartos renales múltiples, tiflitis hemorrágica, necrosis fokal en pulmón y miasis gástrica moderada	Infarto renal	1:50 <i>autumnalis</i> , <i>hardjo</i> , <i>bratislava</i> y <i>celledoni</i>
505	Gastritis hemorrágica, miasis gástrica, enteritis catarral, tiflitis hemorrágica marcada y colitis hemorrágica multifocal	S / D	1: 100 <i>pomona</i> y <i>pyrogenes</i>
506	Esplenomegalia, hepatomegalia y congestión pulmonar	S / D	1: 50 <i>hardjo</i> y <i>pyrogenes</i>
508	S / D	S / D	1:100 <i>ballum</i> , <i>bataviae</i> , <i>hardjo</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> 1:200 <i>pyrogenes</i> 1:800 <i>autumnalis</i>
509	S / D	S / D	1: 100 <i>australis</i> , <i>celledoni</i> , <i>hardjo</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> 1: 200 <i>ballum</i> y <i>pomona</i> 1:400 <i>bratislava</i>
510	S / D	S / D	1: 100 <i>autumnalis</i> 1:200 <i>bataviae</i> 1:800 <i>pomona</i> 1:3200 <i>pyrogenes</i>
511	S / D	S / D	1:200 <i>bratislava</i> 1:400 <i>ballum</i>

Tabla 7. GRUPO TETANOS (Continuación)			
512	S/D	S/D	1:100 <i>szwajizak</i> 1:200 <i>cynopteri</i> , <i>hardjo</i> , <i>pomona</i> 1:400 <i>autumnalis</i> y <i>ballum</i> ,
514	Avanzados cambios post-mortem, gastritis, enteritis y tiflitis hemorrágicas severa, nefropatías e infartos renales.	S/D	1:200 <i>autumnalis</i> 1:400 <i>grippotyphosa</i> 1:800 <i>bratislava</i>
515	S/D	S/D	1:400 <i>pyrogenes</i>
11	Anemia aguda, choque hipovolémico por desangrado	S/D	1:200 <i>bratislava</i>
15A	Hemorragia multifocal en corteza renal, bronconeumonía en un 40 % y congestión pulmonar	Hepatitis difusa supurativa, edema y congestión pulmonar severa	1:400 <i>autumnalis</i>

TABLA 7. GRUPO VIPERINO n=31 Mortalidad 64.5%			
#	Necropsia	Histopatología	AM
4V	Cambios post-mortem	S/D	1:100 <i>autumnalis</i> , <i>bataviae</i> 1:800 <i>pomona</i>
7V	Enteritis catarral, tiflitis catarral con petequias, ascariasis leve, hepatopatías, nefropatías y congestión pulmonar 50 %.	S/D	1:100 <i>autumnalis</i> , <i>bratislava</i> y <i>pyrogenes</i> 1:200 <i>australis</i> , <i>bataviae</i> y <i>hardjo</i>
9	Hepatitis con fibrosis difusa, gastroenteritis y tiflitis hemorrágica severa y colitis hemorrágica difusa.	Trombosis en la submucosa intestinal, hepatitis supurativa con fibrosis portal leve e hiperplasia de conductos biliares y congestión renal	1:100 <i>australis</i> , <i>grippotyphosa</i> , y <i>hardjo</i>
16A	S/D	S/D	1:100 <i>australis</i> , <i>bataviae</i> y <i>hardjo</i> 1:200 <i>autumnalis</i> , <i>ballum</i> y <i>bratislava</i> 1:400 <i>pomona</i>

Tabla 7. GRUPO VIPERINO		(Continuación)	
92	Nefritis supurativa embólica con abundantes bacterias y necrosis focal, hepatitis supurativa portal leve y congestión pulmonar	S / D	1:100 <i>autumnalis</i> , <i>grippotyphosa</i> y <i>hardjo</i>
109	Trombosis pulmonar	S / D	1:50 <i>australis</i> , <i>cynopteri</i> , <i>grippotyphosa</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> .
119	Cambios post-mortem	S / D	1:100 <i>australis</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> .
124	Edema moderado en abdomen, congestión y antracosis pulmonar, dilatación del ventrículo derecho con degeneración mucoide de la grasa pericárdica. Degeneración mucoide de la grasa perirrenal y palidez de ambos riñones y médula ósea congestionada.	S / D	1: 200 <i>pomona</i>
549	Cambios post-mortem	S / D	1:100 <i>icterohaemorrhagiae</i>
550	S / D	S / D	1:100 <i>autumnalis</i>
551	Enteritis, tiflitis y colitis hemorrágicas severas con focos de necrosis y congestión pulmonar en 80%	Enteritis necrótica moderada con presencia de numerosos bacilos. En la submucosa se observaron algunos trombos bacterianos	1:100 <i>autumnalis</i> y <i>pyrogenes</i> 1:400 <i>australis</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
552	Enteritis y tiflitis catarral moderadas, colitis catarral leve, nefropatías, congestión pulmonar y bronconeumonía en un 30 %	S / D	1:100 <i>autumnalis</i> 1:200 <i>australis</i> 1:400 <i>icterohaemorrhagiae</i>
553	Cambios post-mortem	S / D	1: 100 <i>hardjo</i>
555	S / D	S / D	1:50 <i>australis</i> , <i>bratislava</i> , <i>hardjo</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
556	S / D	S / D	1:100 <i>ballum</i> , <i>pomona</i> 1:200 <i>hardjo</i>

Tabla 7. GRUPO VIPERINO (Continuación)			
558	ictericia generalizada, hepatopatías, hemorragia focal del miocardio y nefropatías	Nefritis intersticial difusa moderada con presencia de pequeños trombos pequeños en la zona medular y en hígado metamorfosis grasa moderada difusa.	1:100 <i>pyrogenes</i> 1:200 <i>hardjo</i> 1:400 <i>icterohaemorrhagiae</i>
559	Cambios post-mortem	S / D	1:100 <i>pyrogenes, tarassovi</i> 1:200 <i>australis</i> y <i>hardjo</i> 1:400 <i>autumnalis</i> 1:1600 <i>icterohaemorrhagiae</i>
561	S / D	S / D	1:100 <i>australis</i> y <i>autumnalis</i>
563	S / D	S / D	1:200 <i>australis</i>

TABLA 7. GRUPO ANIMALES NO INMUNIZADOS n=6 Mortalidad 50%			
#	Necropsia	Histopatología	AM
CH 1A	Distensión intestinal severa, distensión de la vejiga urinaria y útero ocupado por un producto de gestación de 8 meses aproximadamente	S/D	-
CM	Cambios post-mortem	S/D	1:50 <i>autumnalis</i> y <i>bataviae</i>
1A	Trombos múltiples en hígado y pulmón. hepatopatías degenerativas, infartos múltiples renales, enfisema pulmonar 15%, endometritis hemorrágica, acidosis estomacal y enteritis hemorrágica multifocal	S/D	1:50 <i>celledoni</i> , <i>hardjo</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>

\* S/D : sin datos

Animales con posibles lesiones de leptospiras (títulos de anticuerpos  $\geq$  1: 400).

## DISCUSIÓN

Se han realizado diversos exámenes serológicos a nivel mundial, determinando que los niveles de anticuerpos en equinos, han sido adquiridos de una infección natural (11, 122, 141). En México, la vacunación de equinos contra leptospirosis no se realiza, por lo que asumimos que los anticuerpos detectados fueron adquiridos por el contacto natural directo o indirecto con el microorganismo.

Las serovariedades que con más frecuencia se detectaron fueron: *autumnalis*, *australis*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *hardjo*, *pyrogenes*, *bratislava* y *ballum* (Tabla 4).

Esto concuerda parcialmente con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Legorreta (1972), quién detectó: *pomona*, *bratislava* y *borincana* como las de mayor incidencia, además de detectar también: *bataviae*, *pyrogenes*, *ballum* y *hardjo* (90).

Respecto a las serovariedades con títulos más altos encontramos con 1: 6400 *autumnalis*, *cynopteri* y *pyrogenes* (2.8 %); con título de 1: 3200: *australis*, *celledoni*, *szwajizak*, e *icterohaemorrhagiae* (9.4 %). Estos resultados contestan con el hecho de que entre los animales en estudio sólo se encontró un caso de

iridociclitis (caballo 32) y sin signos clínicos de leptospirosis en los demás equinos.

Los equinos que mostraron títulos de anticuerpos con más de 2 serovariedades (Apéndice II), indica la posible evidencia de infecciones mixtas o reacciones cruzadas entre diferentes serovariedades. Ancha (1986), menciona que en los primeros estadios de la infección (2 a 3 semanas), el organismo puede exhibir reacciones cruzadas con diferentes serovariedades de leptospiras, al extremo de que la reacción resulta alta con una serovariedad heteróloga que con la causante de la infección. Este fenómeno paradójico desaparece a medida que la enfermedad progresa, emergiendo el verdadero agente etiológico a títulos más altos; confusión que se puede aclarar mediante exámenes seriados necesitándose a veces más de 2 pruebas, separadas por lo menos 15 días (166).

Estudios serológicos han mostrado evidencia de infección subclínica por un amplio rango de serovariedades incluyendo *hardjo* y *tarassovi* en Queensland (83); *mitis*, *icterohaemorrhagiae* y *canicola* en Victoria (82). Un estudio en Gran Bretaña, detectó reacciones hacia 14 serogrupos de leptospiras en equinos para la exportación (66).

La serovariedad *bratislava* en Irlanda (49) y Ontario (84), ha sido reconocida como de alta prevalencia en equinos, siendo estos hospedadores que comúnmente mantienen a esta serovariedad (84, 126, 161).

La prevalencia de la serovariedad *bratislava* en este estudio fue de 16.9 % con títulos desde 1: 100 hasta 1: 800, por otro lado, *australis* fue la segunda serovariedad más frecuente con 28.3 %. Ambas serovariedades pertenecen al serogrupo Australis, y en conjunto representarían la mayoría de las reacciones positivas en este estudio (45.2 %), coincidiendo entonces con lo previamente reportado (84, 89, 126).

La mayoría de los equinos que fueron positivos a la serovariedad *bratislava* fueron de edades superiores a 4 años y no manifestaron signos clínicos. Kitson-Piggot y cols. (1987), observaron un incremento significativo con la edad con respecto a la serovariedad *bratislava*; encontrando un 5% en equinos de 3 años de edad y 52% en equinos con 7 años de edad (84).

En el caso de *icterohaemorrhagiae* y *ballum* fueron detectados para estas serovariedades 23.5 y 16% de reactores positivos. Se ha visto que es predominante encontrar en la rata (*Ratus norvegicus*) (15, 65, 91), a la serovariedad *icterohaemorrhagiae* y que el portador primario de *ballum* es el ratón (*Mus musculus*) (65). Esto nos lleva a considerar entonces que las

reacciones positivas a esas serovariedades posiblemente se deben a la presencia de roedores, lo que es un hecho en las condiciones de alojamientos en que se encontraban los equinos en estudio.

Para la serovariedad *pomona* se detectaron 24.5 % de seropositivos que resulta bajo comparándolo con el trabajo realizado por Shimada (1964), quien detectó que en una población de equinos del D.F., estos mostraron seropositividad en un 70% a la serovariedad *pomona*,(131).

Sin embargo, ésta serovariedad ha sido reportada en otros estudios como agente etiológico asociado con abortos, retención placentaria, muerte neonatal (48, 70); así como uveítis (66, 134), apareciendo esta serovariedad como la más patógena en el equino (20, 163). A pesar de ello en ambos estudios los equinos positivos a *pomona* se encontraban clínicamente sanos.

Se sabe que la serovariedad *hardjo*, es de distribución mundial en los bovinos, siendo causante de retención placentaria, muerte neonatal e infertilidad (66, 72, 146). En este estudio se detectó el 19.8% de seropositivos contra *hardjo* y de acuerdo con otros estudios en los que se menciona que los equinos que son usados para trabajar con vacas, estos pueden sufrir infecciones cruzadas (38, 48, 142), cabe hacer mención que de los caballos en estudio, procedían de establos

lecheros (8 animales), y 4 de ellos mostraron títulos desde 1: 50 hasta 1: 200 contra *L. hardjo* (Apéndice II).

De acuerdo a los datos obtenidos, existe evidencia de que los equinos adquieren la infección a partir del contacto con la orina de otros equinos o mediante infección cruzada con roedores, vacas, cerdos y otros animales. Por otro lado los equinos parecen ser resistentes hacia la enfermedad clínica aguda (124, 136).

Se encontró un sólo caso de uveítis unilateral izquierda (suero # 32), reportando títulos de 1: 200 a la serovariedad *icterohaemorrhagiae* (Apéndice II). Con base en la relación existente entre la lesión y la presencia de leptospiras en líquidos oculares a través de microscopía de campo oscuro, así como extensos estudios realizados en E.U. y en otras partes del mundo (22, 34, 63, 95, 96), se podría concluir que el origen más común de URE es el que contempla a la leptospirosis.

En cuanto a los resultados obtenidos en la HDD y la CIEF, los antisueros de los equinos de los grupos Difteria, Alacrán, Viperino y Tétanos dieron líneas muy claras de precipitación estrecha en ambas pruebas, las líneas aparecen juntas unas a otras en tales reacciones, representando diferentes sistemas antígeno- anticuerpo y distinguiéndose con facilidad. Esto puede ser debido a que los equinos se

someten a protocolos de inmunización con antígenos purificados, solubles así como la adición de adyuvantes. En contraste los hallazgos de IDD y CIEF en los antígenos rábicos y leptospirales no fueron consistentes.

Ningún suero mostró identidad en las pruebas IDD o CIEF contra antígenos leptospirales, quizá debido al método utilizado para la extracción de antígeno que no contempló la extracción de LOS en particular sino de proteínas totales.

El LOS, como constituyente de la cubierta celular de leptospira, se le ha considerado como un buen inmunógeno siendo el único antígeno blanco para anticuerpos opsonisantes y aglutinantes (2, 75, 110).

Por otro lado Myers observó que en estados de infección crónica la detección de anticuerpos aglutinantes mediante AM se mantenía mientras que anticuerpos precipitantes detectables mediante CIEF, se perdía a los 38 días post-infección (106). Los animales en estudio pudieron mantener entonces infecciones crónicas y que por lo tanto no manifestaron anticuerpos precipitantes en CIEF.

El caso de la reacción de identidad total detectada en el suero 545 entre rabia III,IV-pomona, pudiera deberse a que alguno de los antígenos tenga algún elemento en común, reaccionando de esta manera.

Sütes (1985), menciona que en ocasiones se encuentran epitopos idénticos o similares en moléculas que aparentemente no están relacionados, dando como

resultado que los anticuerpos se dirijan hacia el antígeno, reaccionando de esta manera inesperada con un antígeno no relacionado (139).

Sin embargo no podemos descartar que nuestra extracción del antígeno leptospira fué exclusivamente proteína, pues de acuerdo a la técnica usada posiblemente podemos encontrar además lípidos, carbohidratos, etc., por lo que se sugiere perfeccionar la técnica de extracción, así como pruebas específicas que nos indique que componente de la bacteria es la que esta ocasionando esta reacción.

No obstante ninguno de los sueros positivos a *pomona* mostró una reacción similar (2 de ellos procedentes de equinos inmunizados contra el virus rábico) ni ninguno de los sueros antiviral rábico mostró identidad inmunológica en IDD contra alguna otra serovariedad de leptospira.

Cabe hacer mención que este caso de identidad se observó en particular con el virus cepa PV-11-PM (Origen Pasteur) (Tabla 3), que al igual que la bacteria, no sabemos que parte de la vacuna en general esta causando reacción, no significando que el virus como tal sea el que este reaccionando, sino que podría ser también algún elemento en el que está diluido el antígeno el que provoque esta reacción y también lo más contraproducente sea sólo un caso ((0.02%); por lo que se sugiere volver a evaluar este resultado con otro tipo de pruebas.

Con respecto a la inmunización de los conejos con los antígenos usados para la producción de sueros hiperinmunes en caballos, se desafiaron estos antisueros contra las leptospiras en la prueba AM y se demostró que no existen reacciones cruzadas entre estos antígenos y el LOS de leptospira.

Ninguno de los sueros de conejos inmunizados reaccionó contra ninguna serovariedad con títulos de 1: 50, razón por la cual no fueron enfrentados en IDD contra antígenos de leptospira.

Los animales en estudio no fueron muestreados subsecuentemente, sin embargo las lesiones observadas en la necropsia coinciden con lo reportado para leptospirosis correspondiendo además con títulos de anticuerpos elevados (105, 166).

Esto fue observado en el 15.2 % de los equinos muertos en un periodo de 12 meses posteriores al sangrado inicial, esto es 9 de 59 casos mostraron títulos  $\geq$  1: 400 contra leptospira y lesiones de hepatopatías, nefropatías, enteritis hemorrágicas o congestión pulmonar; también en los animales inferiores a 1: 400 en la AM, 14 de ellos (23.7%) mostraron alguna lesión coincidente con leptospirosis (Tabla 7); por lo que se requiere otro tipo de técnicas de laboratorio para poder confirmar la presencia de la enfermedad.

## CONCLUSIÓN

\* De los serotipos detectados: *autumnalis* (33%) es el que se encontró más difundido en esta población equina, seguida en orden de importancia por *australis* (28.3%), *pomona* (24.5%), *icterohaemorrhagiae* (23.5%), *hardjo* (19.8%), *pyrogenes* (17.9%), *bratislava* (16.9%) y *ballum* (16%).

\*Los equinos en estudio fueron de seroprevalencia alta 83.9% e independientemente de las condiciones de estímulo antigénico a la que son sometidos, considerando que el grupo control mostró igualmente títulos de hasta 1: 3200 a la serovariedad *celledoni* en un animal y 1: 800 a las serovariedades *bataviae* e *icterohaemorrhagiae* en 4 de 6 animales (Apéndice II)

\*Los títulos de 1: 100 o superiores en una sola muestra frente a uno o más antígenos leptospirales, sólo es una evidencia indicativa de una enfermedad anterior o posible infección en curso, por esta razón, es necesario examinar por lo menos 2 muestras con intervalos de 2 a 3 semanas.

\*En el caso de la reacción de identidad total detectada entre rabia III,IV-pomona, pudo deberse a que los anticuerpos tengan alguna afinidad y hayan reaccionado con determinantes estrechamente relacionados, por lo que es necesario el apoyo de otras pruebas como Inmunotransferencia para evaluar este resultado.

\*No fue posible encontrar relación entre los títulos de anticuerpos y las lesiones encontradas en la necropsia e histopatología; por lo que se necesitan otro tipo de pruebas de laboratorio, como tinciones, hibridación de ADN o PCR; para confirmar la presencia de la bacteria.

\* La presencia de leptospirosis en esta población representa un problema de salud para el personal que manipula a estos animales; un riesgo de transmisión entre ellos, así como un factor importante para la persistencia de la enfermedad en el medio.

\*Es necesario el monitoreo serológico potencial de otras importantes poblaciones de equinos, así como la aplicación de metodología tendientes a la detección del antígeno en muestras clínicas ( tinciones, cultivo, hibridación de ADN y PCR ) que contribuyan a determinar la prevalencia de esta enfermedad en los equinos de nuestro país

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abrams, K.L. and Brooks, D.,E.: Equine recurrent uveitis: Concepts in diagnosis and treatments. *Equine Pract.* 12: 27-35 (1990).
2. Adler, B., Mitchison, M., Bulach, D.M., Vinh, T., Rajakumar, K. and Faine, S.: Identification and characterization of the dTDP-Rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related *rtb* locus in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Bacteriol.* 1979: 1262 -1267 (1997).
3. Ancha, P.N.: Zoonosis: enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a.ed. *Organización Panamericana de la Salud*. Washington, 1986.
4. Arean, V.M.: The pathologic anatomic and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil' disease). *Am. J. Pathol.* 40: 393 (1962).
5. Attenburrow, D.P., Donnelly, J.J. and Soulsby, E.J.L.: Periodic ophthalmia of horse: An evaluation of the aetiological role of microfilariae of *Onchocerca cervicalis* and the clinical management of the condition. *Eq. Vet. J. Supp.* 2: 48 - 56 (1993).
6. Ballard, S.A., Williamson, M., Alder, B., Tu, V. And Faine, S.: Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 21: 59 - 67 (1986)
7. Barragán, S.C.: Estudios morfopatológicos de caballos productores de sueros hiperinmunes procedentes del Instituto Nacional de Higiene. Tesis de Licenciatura. FES - C UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1992.
8. Bazovska, S.:Sphingomyelinase activity of leptospira cultures. *Czech. Epidem. Microbiol. Immunol.* 27: 137 - 143 (1978).
9. Beer, J.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Tomo II. *Acribia* Zaragoza, España. 1981.
10. Bellanti, J.A.: Inmunología. 2a. ed. *Interamericana*. México 1981.
11. Bernard, W.V.:Leptospirosis. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 9: 435-444 (1993).

12. Bernard, W.V., Bolin C., Riddle, T., *et al*: Leptospirosis in horses on a Central Kentucky Farm. *J. Am. Med. Assoc. in press.*
13. Biberstein, Z.: Review of Veterinary Microbiology. *Blackwell Scientific publication Inc.* Boston, 1990.
14. Binns, M.M.: The application of molecular biology to the study of veterinary infections disease. *British Vet. J.* 149: 21-30 (1993).
15. Blaha, T.: Applied Veterinary Epidemiology. *Elsevier Science Publishers.* New York, 1988.
16. Blenden, D.C.: Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. Memorias de la VII reunión interamericana sobre el control de la Fiebre aftosa y otras zoonosis. *Publicación Científica No. 316.* Buenos Aires, Argentina (1976).
17. Blood, D.C., Henderson, J.A. y Radostitis, Q.H.: Medicina Veterinaria. 6a. ed *Interamericana.* México, 1986.
18. Bolin, C.A., Zuerner, R.L. and Trueba, G.: Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo - bovis* in bovine urine. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1001 (1989).
19. Bromley, D.B. and Charon, N.W.: Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 137: 1406- 1412 (1979).
20. Broughton, E.S. and Flack, L.E.: The susceptibility of strain of *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae to amoxyllin, erythromycin, lincomycin, tetracycline, oxitetracycline and minocycline. *Zbl Bakt Hig* 261: 425 (1986).
21. Cacchione, R.A., Cascelli, E., Saravi, M., Martínez, E., Carreras, F.F. y Niizawa, M.: Leptospirosis equina: Estudio serológico y epizootiología en animales del ejército de Argentina. *Rev. Mil. Vet.* 23: 36-95 (1976).
22. Campos, T.J.M.: Contribución a la investigación de leptospirosis por microscopía en líquidos oculares con caballos con iridociclitis, positivos a la

- aglutinación rápida en placa. Tesis de Licenciatura. *Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. México D.F. 1964.*
23. Carpio, M.M. and Iverson, J.O.: A serological survey of *Leptospira interrogans* serotype *pomona* in Saskatchewan horse. *Can. Vet. J. 20: 127 (1979).*
24. Cole, J.R. Jr.: Spirochetes, in: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology, ed. Carter, G.R., Cole, J.R. Jr., *Academic Press. San Diego C.A. 1990.*
25. Cole, J.R., Jr, Pursell, A.R.: Serologic incidence of leptospirosis in Georgia Horses. *Proc. Annu. Meet. US. Anim. Health Assoc. 77: 632 - 637 (1973).*
26. Cole, J.R., Sulzer, C.R. and Pursell, A.R.: Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol. 25: 976 (1973).*
27. Cottral, G.E.: Manual on standardized methods for Veterinary Microbiology. *Cornell Univ. Press. New York 1978.*
28. Cottral, G.E.: Microbiología Veterinaria. *Continental. México, D.F. 1986.*
29. Cooley, P.L., Milvae, R., Riis, R.C. and Laratta, L.J.: Effect of flunixin meglumine on prostacyclin accumulation in the equine eye. *Am. J. Vet. Res. 45: 1383 - 1385 (1984).*
30. Craig, E. G.: Clinical microbiology and infections diseases of the dog and cat. *W.B. Saunders Company. Toronto, 1984.*
31. Crane, C.S.: A report on leptospirosis in a herd of Shetland ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc. 129: 260 - 262 (1956).*
32. Crowle, A.J.: Immunodifusión 2a. ed. *Academic Press. New York, 1973.*
33. Cynthias, S., Cook, R.L. and Harling, D.E.: Equine Recurrent Uveitis. *Equine Vet. J. 2: 57- 60 (1983).*
34. Davidson, M.G., Nasisse, M.P. and Roberts., S. M.: Immunodiagnosis of leptospiral, uveitis in two horses. *Equine Vet. J. 19: 155 (1987).*

35. Del Real, G., Seeger, R.P.A.M., Van der Zeijst, B.A.M. and Gaastra, W. : Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect. Immun.* 57: 2588- 2590 (1989).
36. De la Peña, M.A., Aluja, S.A.; Hernández, G.F., Rodríguez, R.F.A., Gómez, B.A., García, M.A.R. y Verdugo, R.A.: Detección de *L. interrogans* en bovinos: estudios serológicos, microscópicos, bacteriológico y molecular. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buriatría 1997.
37. Díaz de la Vega, Y.P.J.: Leptospirosis Equina. Seminario de Titulación en área de animales se servicio y compañía. *Fac. de Med. Vet. Zoot.* UNAM. México, 1990.
38. Dietz, O. and Weisner, E.: Diseases of the horse. *Karger*. Berlin, Rep. Democrática Alemana. 1984.
39. Divers, T.J., Bryans, T.D. and Shin, S.J.: Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201: 1391 - 1392 (1992).
40. Draghi, G.M., Zurbriggen, A.M., Vanzini, V.R., Homse, A.C., Rochinotti, D., Soni, C.A. y Baéz Kochn, A.R.: Estudio serológico de la leptospira bovina en la provincia de Corrientes, Argentina. *Vet. Arg.* 3: 357- 363 (1986).
41. Edwards, G.A. and Domm, B.M.: Human Leptospirosis. *Medicine* 39: 117 (1960).
42. Edwin, H.L.: Manual de Microbiología Clínica. 4a. ed. *México Panamericana*. Buenos Aires, Argentina 1987.
43. Egan, J. and Yearsley, D.: A serological survey of leptospiral infection in horses in the Republic of Irland. *Vet. Record* 119: 306 (1986).
44. Einstein, B.L.: The polimerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 322:178-183 (1990).
45. Ellinghausen, H.C. and Mc Cullough, W.C.: Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fraccionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26:45-51 (1965).

46. Ellis, W.A., Montgomery, J. and Casell, J.A.: Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Res. Vet. Sci.* 39 :292 (1985).
47. Ellis, W.A., Mac Farland, P.J., Bryson, D.G., Thiermann, A.B. and Montgomery, J.: Isolation of leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet. Rec.* 118: 294 (1986).
48. Ellis, W.A., and O' Briend, J.J.: Leptospirosis in horses. In: Equine Infectious Disease V. proceedings of the Edited by David G. Powell, pp 168-171. Fifth International Conference. *The University Press of Kentucky* Lexington, Kentucky, 1987.
49. Ellis, W.A., and O' Briend, J.J., Cassells, J.A., et al: Leptospiral infection in horse in Northern Ireland: Serological and microbiological findings. *Equine Vet. J.* 15: 317 (1983).
50. Ellis, W.A., and O' Briend, J.J. and Neill, S.D.: Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 110: 178 (1982)
51. Ellis, W.A., O' Briend, J.J. and Neill, S.D.: Microbiological and serological findings in normal fetuses removed from the uteri after slaughter. *Vet. Rec.* 109: 192-194 (1982).
52. Estrada, P.S., Castro, M. Ma. E., Oltra, R.A. y Correa, M.B.: *Inmunología Básica y Clínica*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de Graduados. *Dpto. de Inmunología IPN*. 1994.
53. Faine, S. and Kaipainen, W.J. : Erythromycin in experimental leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 97: 146 (1953).
54. Fennestad, K.L. and Borg-Peterson , C.: Fetal leptospirosis and abortion in cattle. *J. Infect. Dis.* 102: 227 - 236 (1958).
55. Ferguson, L. C., Bohl, E.H. and Powers, T.E.: Leptospirosis in swine. *Proc. 59 th. Ann. Meet. U.S. Live Stk. Samt. Ass.* 332 - 336 (1956).

56. Fernández, S.I: Demostración de *L. pomona* por anticuerpos fluorescentes en riñón de ganado bovino raza holstein sacrificado en el rastro del D.F.Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Zoot.* UNAM. México, 1963.
57. García, M.A.R., Rodríguez, R.E.A. y De la Peña, M.A.: Detección de *Leptospira interrogans* mediante la técnica de hibridación *in situ*. Reunión Nacional de Investigación pecuaria. Cuernavaca, Mor. 1996, pp. 97. *INIFAP, México D.F.*, (1996).
58. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: *Methods in immunology*. 3a. ed. *W.A. Benjamin Inc. Publishers.* Massachusetts, 1977.
59. Giorgi, W., Teruya, M.J., Macruz, R., Genovez, E.M., Silva, A.S. and Borgo, F.L. : Leptospirose en equinos: Inquérito serológico e isolamento de leptospiros *icterohaemorrhagiae* de feto abortado. *Biologico Sao Paulo* 2: 47- 53 (1981).
60. Gregoire, N., Higgins, R. and Robinson, Y.: Isolation of leptospiros from nephritic kidneys of beef cattle a slaughter. *Am. J. Vet. Res.* 48: 370 (1987).
61. Haake, D.A. , Walke, E. M., Blanco, D.R., Bolin, C.A., Miller, J.N. and Lovett, M.A.: Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa* during in vitro cultivation. *Infect. Immun.* 59: 1131 - 1140 (1991).
62. Habin, D.J. : Equine traumatic uveitis. *Equine Vet. Educ.* 6: 122 - 127 (1994).
63. Halliwell, R.E., Brim, T.A., Hines, M.T., *et al*: Studies on Equine Recurrent Uveitis II: The role of infection with *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. *Curr. Eye Res.* 4: 1033- 1040 (1985).
64. Hanson, L.E.: Control of Bovine Leptospirosis . *Bovine Pract.* 7: 17 - 21 (1972).
65. Hanson, L.E.: Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 119: 1506 (1982).
66. Hathaway, S.C., Little, T.W., Finch, S.M. and Stevens, A.E.: Leptospiral infection in horses in England : A serology study. *Vet. Rec.* 108: 396- 398 (1981).

67. Higgins, R. and Coyovette, P.: Serological diagnosis of leptospirosis in the Province of Quebec. *Can. Vet. J.* 9: 13 - 16 (1978).
68. Hines, M.T.: Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet. Clin. N. Am.* 6: 501- 512 (1984).
69. Hodges, R.T., Thompson, J. and Townsed, K.G.: Leptospirosis in pigs: The effectiveness of dihydrostreptomycin in stopping leptospiruria. *N. Vet. J.* 27: 124 (1979).
70. Hogg, G.G.: The isolation of *Leptospira pomona* from a sick foal.: *Austr. Vet. J.* 50. 326 (1974).
71. Hollet, R.B.: Equine Leptospirosis. *Equine Vet. Data* 12: 210 - 211 (1991).
72. Howard, G.J. y Francis, T.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. *La prensa Médica Mexicana* México D.F. 1981.
73. Hudson, L. and Hay, F.C.: Practical immunology. 3a. ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. 1989.
74. Isogai, E., Isogai, H., Fujii, N. and Oguma, K.: Macrophage activation of leptospiral lipopolysaccharide. *Int. J. Med. Microbiol.* 273: 200 - 208 (1990).
75. Isogai, E., Kitagawa, H., Isogai, H., Matsuzawa, T., Shimizu, T., Yanagihara, Y. and Katami, K.: Effects of leptospiral lipopolysaccharide on rabbit platelets. *Int. J. Med. Microbiol.* 271: 186-196 (1989).
76. Isogai, E. H. and Ito, N.: Decreased lipopolisaccharide content and enhanced susceptibility of leptospiras to serum bactericidal action and phagocytosis after treatment with diphenylamine. *Zentralb. Bakteriol. Hyg. A.* 262: 438- 447 (1986).
77. Ito, T. and Yanagawa, R.: Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L 929) cells: *Vet. Microbiol.* 15: 89- 96 (1987).
78. Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: Experimental immunochemistry 2th. *Charles C. Thomas Publishers.* New York, 1971.

79. Keenan, K.P.: Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans* serovar *bataviae* infection in the dog: Microbiological, clinical, hematological and biochemical studies. *Am. J. Vet. Res.* 39: 449 (1978).
80. Kenneth, L.A. and Dennis, E.B.: Equine recurrent uveitis: Current concepts in diagnosis and treatment. *Equine Pract.* 2: 27- 35 (1990).
81. Ketchum, P.A.: Microbiology: Concepts and Applications. *Wiley Printed.* New York, 1988.
82. Kirkman, D.B., Campbell, R.S.F. and Miller, R.I.: Observation on equine leptospirosis. *Aust. Vet. J.* 59: 124 (1983).
83. Kiston - Piggot, A.W. and Prescott, J.F.: Leptospirosis infection in horses in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 51: 448 (1987).
84. Kitson- Piggot, A. W. and Prescott, J.F.: Leptospirosis in horses in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 51: 448- 451 (1987).
85. Krieg, N.R. and Holt, J.G.: Leptospirosis in Bergey's: Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. *Williams & Wilkins*, Baltimore, USA, 1984.
86. Lal , K.N., Aarons, I., Woodroffe, A.J., et al : Renal lesions in leptospirosis. *Aust. N. Z. J. Med.* 12: 276 (1982).
87. Larrade, C. y Barbosa, H.: Aspectos inmunológicos en la producción industrial de antitoxinas. *Ciencias Vet.* (1976).
88. Lavach, J.D.: Large animal ophthalmology. *C.P. Mosby Co., St. Louis.* 1989.
89. Lees, V.W., Gale, S.P: Titers to leptospira species in horse in Alberta. *Can. Vet. J.* 35: 636 - 640 (1991)
90. Legorreta, P.J.: Exploración serológica de leptospirosis equina en el D.F. utilizando 19 serotipos. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Zoot.* UNAM. 1972.
91. Lennett, E.H.: Manual de Microbiología clínica. 4a. ed. *Medica Panamericana*, Buenos Aires, Argentina. 1987.

92. Lescure, F.L.: Uveitis isolee. *Bull Acad. Vet. de France* 63: 317- 320 (1990).
93. Lubashenko, S.V. and Novikova, L.S.: Symptoms, diagnosis, prophylaxis and therapy of equine leptospirosis (title trans) *Veterinariya* 24: 7 (1947).
94. Lubashenko, S.V. and Novikova, L.S.: Leptospirosis in horses (title trans). *Veterinariya* 24: 11 (1947).
95. Matthews, A.G. and Hanscombe, M.C.: Uveitis in the horse: A review of the aetiological and immunopathological aspects of the disease. *Eq. Vet. J. Supp.* 2: 61- 64 (1983).
96. Matthews, A.G., Witkins, S.A. and Palmer, M.F.: Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom. *Equine Vet. J.* 19: 125 - 128 (1987).
97. Merchant, I.A.: Clasificación y características de la bacteria y mohos patógenos. *Acribia*. Zaragoza, 1980.
98. Merchant, I.A. y Packer, R.A.: Bacteriología y Virología Veterinaria. 3a. ed. *Acribia* Zaragoza, España, 1980.
99. Miller, N. G., Froehling, R.C. and White, R.A.: Activity of leptospire and their products on L cell monolayers. *Am. J. Vet. Res.* 31: 371 - 377 (1970).
100. Miller, N.G. and Wilson, R.B.: Electron microscopy estudy of thee relationship of *Leptospira pomona* to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. *Am. J. Vet. Res.* 28: 225- 235 (1967).
101. Miragliotta, G. and Fumarola, D.: In vitro effect of *Leptospira icterohaemorrhagiae* on human mononuclear leukocytes procoagulant activity: Comparison of virulent with nonvirulent strain. *Can. J. Comp. Med.*: 4770 - 4773 (1983).
102. Millichamp, N.J. : Ocular trauma. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8: 521 - 536 (1992).
103. Muhamed, Y.: Microbiology for Veterinary Technicians. *Am. Vet. Publ.* Goleta California 1991.

104. Murray, M.J. and Dennis, E.B.: Treatment of equine recurrent uveitis. *Equine Vet. Data* 14: 124 - 125 (1993).
105. Myers, D.M.: Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis OMS. *Organización Panamericana de la Salud*, 1985.
106. Myers, D.M.: Serodiagnosis of Human Leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 897 - 899 (1987).
107. Nerving, R.M. and Garret, L.A.: Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1197 (1979).
108. Nicolet, J.: Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. *Actibia*. Zaragoza, España 1986.
109. Niikura, M., Ono, E. and Yanagama, R.: Molecular comparison of antigens and proteins of virulent and avirulent clones of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*, strain *shibaura*. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* 266: 453 - 462 (1987).
110. Nixdorff, K., Weber, G., *et al*: Microbial infections: Bacterial protein LPS complexes and immunomodulation. *Plenum Press* New York, 1992.
111. Olivares, V.S.: Análisis comparativo del funcionamiento hepático en caballos productores de sueros hiperinmunes en base a su perfil bioquímico. Tesis de Licenciatura. *FES-C. UNAM*. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1989.
112. Ouchterlony, O.: Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. 6a. ed. *Ann. Arbor Science Publishers* Michigan, 1973.
113. Park, Y.G., Gordon, J.C., Beech, N.S., and Slemons, R.D.: Factors for seropositives in horses. *Prevent Vet. Med.* 13: 121- 127 (1992).
114. Poonactia, K.B., Donahue, J.M., Gyles, R.C. Hong, C.B., Petrites-Murphy, M.B., Smith, B.J., Swerczek, T.W., Tramontin, R.R. and Tuttle, P.A.: Leptospirosis in equine fetuse, stillborn foals and placentas. *Vet. Pathology* 30: 362- 369 (1993).
115. Prescott, J.: Treatment of leptospirosis. *Cornell Vet.* 81: 7 (1991).

116. Prescott, J.F. and Baggot, J.D.: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. *Blackwell Scientific*. Boston, 1988.
117. Prescott, J.F.: Leptospirosis. In Gyles, C.L. and Thoen, C.H. O. Pathogenesis of bacterial infection in animals. Edited by: *Iowa State University Press*. 287 - 296. Ames, Iowa 1993.
118. Ramadas, P., Jarvis, B.W.D., Corner, R.J. Penny, D. and Marshall, R.B.: Genetic characterization of pathogenic leptospira species by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 : 215- 219 (1992).
119. Robinson, E.N.: Terapeutica actual en Medicina Equina 2. *Interamericana*, México 1992.
120. Rodríguez, R.E.A., García, M.A.R., Calderón, G.L.L., Hernández, G.E. y De la Peña, M.A.: Preparación de una sonda ADN para la detección de *L. interrogans*. Reunión Nacional de Investigación pecuaria. Cuernavaca, Mor. 1996, pp 98. *INIFAP*, México D.F., (1996).
121. Rubin, H.L., Cole, J.R. and Elinghausen, H.C.: Laboratory diagnosis of leptospirosis in domestic animals II. Isolation procedures. In Proceeding of the Annual Meeting of the USA Animal Health Association 1981 p. 203.
122. Sandsted, K. and Engvall, A.: Serum antibodies to *Leptospira bratislava* in swedish pigs and horses. *Nord. Vet. Med.* 37: 312 (1983).
123. S.A.R.H.: Investigaciones Pecuarias. Manual de laboratorio del curso de actualización de Inmunología Veterinaria. Palo Alto, D. F. Curso 17- 18 de septiembre de 1979.
124. Sealan, C. M.: Introduction to Veterinary Bacteriology. Library of Congress Cataloging in Publication Data USA 1988.
125. Schwing, K.L.: Equine uveitis. *Ophthalmol.* 8: 557- 574 (1992).
126. Schwing, K.L., Crissman, M. and Rigg, D.L.: Chronic recurrent uveitis in a horse with an elevated aqueous humor antibody titer to *Leptospira interrogans* serovar *autumnalis*. *Equine Pract.* 11: 41-43 (1989).

127. Segers, R.P.A.M. : The molecular analysis of sphingomyelinase genes of *Leptospiraceae*. PhD. diss: University of Utrecht (1991).
128. Segers, R.P.A.M., Van der Drift, A., De Nijs, A., Coreione, A., Van der Zeijst, B.A.M. and Gaastra, W.: Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Infect. Immun.* 58 : 2177 - 2185 (1990).
129. Segers, R.P.A.M., Van der Drift, A., Van eys, G.J.J.M., De Nijs, A., Van der Zeijst, B.A.M. and Gaastra, W. : The presence among *Leptospira interrogans* strains of DNA sequences similar to the sphingomyelinase gene of a serovar *hardjo* strain. In proceedings of the Leptospirosis Research Conference 1990, pp 388 - 399, ed. Y. Kobayashi, Matsujama. Japan. 1990.
130. Shalit, I., Barnea, A. and Shahr, A.: Efficacy of ciprofloxacin against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. *Antimicrob Agent Chemoter* 33: 788 (1989).
131. Shimada, M.A.: Incidencia de aglutinación contra *Leptospira pomona* encontradas en caballos del D.F. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. Zoot.* UNAM 1964.
132. Shimizu, T., Matsusaka, E., Takayanagi, T., Masuzawa, T., Iwamoto, Y., Morita, T., Mifuchi, I. and Yanagihara, Y. : Biological activities of lipopolysaccharide - like substance (L.L.S) extracted from *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. *Microbiol. Immunol* 31:727 - 735 (1987).
133. Shotts, E.B.: Laboratory diagnosis of Spirochetes. In the Biology of parasitic spirochetes. *Academic Press*, New York 1976.
134. Sillerud, C.L. Bey, R.F., Ball, M. and Bistner, S.I.: Serological correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar *pomona* induced uveitis in a group of horses. *J. A. Vet. Med. Assoc* 191: 1576 - 1578 (1987).
135. Sitprijja, V.: Renal involvement in human leptospirosis. *Br. Med. J.* 2: 656 (1968).
136. Slatter, D.H. and Hawkins, C.D.: Prevalence of leptospiral titers in normal horses. *Aus. Vet. J.* 59: 84 (1982).

137. Stalheim, O.H.V.: Chemotherapy of renal leptospirosis in swine. *Am. J. Vet. Res.* 28: 161 (1967).
138. Stalheim, O.H.V.: Virulent and avirulent leptospirae: Biochemical activities and survival in blood. *Am. J. Vet. Res.* 29: 1463 - 1469 (1971).
139. Stites, D.P., Stobd, J.D., Funderberg, H.H. and Wells, J.V.: *Inmunología Básica y Clínica*. 5a. ed. *Manual Moderno*, México D.F. 1985.
140. Sun-Ho, K., Ik-Sang, K., Myung-Sik, C. and Woo-Hyun, C.: Detection of leptospiral DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1035 - 1039 (1994).
141. Swan, R.A., Williams, E.S. and Taylor, E.G.: Clinical and serological observation on horse with suspected leptospirosis. *Aus. Vet. J.* 57: 528-529 (1981).
142. Swart, K.S., Calvery, K., and Meney, C.: The prevalence of antibodies to serovars of *Leptospira interrogans* in horses. *Aust. Vet. J.* 59: 25-27 (1982).
143. Terpstra, W.J., Schoone, G.J. and Ter-Shegget, J.: Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with protein's and biotin-labelled probe. *J. Med. Microbiol.* 22: 23 - 28 (1986).
144. Thiermann, A.B.: Bovine leptospirosis: Bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2244 (1983).
145. Thiermann, A.B.: Evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as a new method for serologic diagnosis of bovine leptospirosis. *Proc. Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diagn.* 1983 p. 97.
146. Thiermann, A.B.: Leptospirosis: Current developments and trends. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 722 - 725 (1984).
147. Thiermann, A.B. and Garret, L.A.: Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 44: 884 (1983).

148. Thiermann, A.B., Handsaker, A.L., Foley, J.W. *et al*: Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroup mini and *sejroe* by restriction endonuclease analysis. *Am. J. Vet. 47*: 61 (1986).
149. Thomas, D.D. and Higbie, L.M. : In vitro association of leptospire with host cells. *Infect. Immun. 58* : 581 - 585 (1990).
150. Thompson, J.C. and Manktelow, B.W.: Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinaemic and non-haemoglobineanemic leptospirosis. *J. Comp. Pathol. 101*: 201- 214 (1989).
151. Timoney, J.F., Gilliespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E.: Microbiology: Hagan and Bruner's. *Comstock Publishing Associates, division of Cornell University Press*. E.U. 1988.
152. Tood, J. D. and Sibbel, R.L.: Enhancing the productivity of the food animal practitioner: Vaccines and biotechnology. *Agri-Practice 12*: 22 - 23 y 27 (1991).
153. Tripathy, D.N., Hanson, L.E., Mansfield, M.E. *et al*: Pathogenesis of *Leptospira pomona* in lactating sows and transmission to piglets. *Proc. Annu. Meet. U.S. Anim Health Assoc. 85*: 188- 191 (1981).
154. Trueba, G.A., Bolin, C. A. and Zuerner, R.L.: Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol. 174*: 4761- 4768 (1992).
155. Tu, V., Adler, B. and Faine, S.: Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Gen. Microbiolo. 135*: 2663 - 2673 (1986).
156. Van den Ingh, T.S. and Hartman, E.G.: Patghology of acute *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* in the Syrian hamster. *Vet. Microbiol. 12*: 367 - 376 (1986).
157. Vega, D.H. : Técnicas de laboratorio de Prácticas de Inmunología. 2a. ed. *Elaboración e impresión de Material Didáctico San Fernando*. Tlalpan, México, D.F., 1994.
158. Verma, B.B., Biberstein, E.L. and Meyer, M.E.: Serologic survey of leptospira antibodies in horses in California. *Am. J. Vet. Res. 30*: 1443 ( 1977).

159. Volina, E.G., Levina, L.F. and Soboleva, G.L.: Phospholipase activity and virulence of pathogenic leptospiraceae. *J.Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 30: 163 - 169 (1986).
160. Waitkins S.A.: Leptospirosis as an occupational disease. *Br. J. Ind. Med.* 43: 721- 725 (1986).
161. Wayne, L.V. and Pamela, S.G.: Titers to leptospira species in horse in Alberta. *Can. Vet. J.* 35: 636- 640 (1991).
162. Weber, W.J., Gramer, H.R. and Bohl, E.H.: Chemotherapy in hamsters chronically infected with *Leptospira canicola*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 129: 271 (1956).
163. Wood, J.L.N.: How important are leptospiral infections as cause the equine disease?. *Equine Vet. J.* 26: 88 (1994).
164. Yasuda, P.A., Stergerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.N., Roger, F. and Brenner, D.J.: Desoxyribonucleic acid related between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 407- 415 (1987).
165. Yearsley, J.E.D.: A serological survey of leptospiral infection in horses in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 119: 306 (1986).
166. Zamora, J. and Riedman, S.: Consideraciones para la interpretación de la prueba de aglutinación microscópica en el diagnóstico de Leptospirosis bovina. *Arch. Med. Vet.* 18: 145- 147 (1986).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **APENDICE I.**

### **1.- AGAR PARA PRECIPITACIÓN AL 1%**

3 g de agar noble  
2.7 g de  $2H_3BO_3$

Diluir en  $H_2O$  bidestilada 300 ml

### **2.- SAF - TRIS ÁCIDO ACÉTICO 3%**

600 g TRIS  
1000 ml de agua destilada  
Ajustar pH con ácido acético glacial al 100% para tener un pH de 8.3

### **3.- AGAROSA PARA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**

0.5 g de agarosa  
Diluir en 40 ml de  $H_2O$  destilada  
SAF 10 ml

## APÉNDICE II.

Resultados individuales de los sueros de los 106 equinos en la prueba de AM.

Grupo: Alacrán n = 9

### Serovariedades

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	1:200	-	1:200	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	1:100	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
84	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	1:200	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:200	-	-	-	-	-	-
518	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
520	-	1:100	1:400	1:100	1:200	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	1:200	-	-	-	-
521	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-	1:100	1:200	-	-	-	-	-	-

Grupo: Difteria n = 12

### Serovariedades

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
3A*	1:200	1:400	-	1:200	-	-	1:100	-	1:100	-	1:100	-	1:200	1:200	1:200	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-
526	-	-	1:400	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-
527	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
529	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	1:400	-	-	-	-	-
530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-
531	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
532	1:100	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
533	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
534	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
535	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grupo: Rabia n = 21

Serovariedades

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
5*	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1600	-	-	1.100	-	1.800	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1.200	1.400	-	-	1.100	1.800	-	1.200	-	-	-	-	1.100	-	-	-	-	-	-
13	1.200	-	-	-	-	-	-	1.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1.3200	-	-	-	-	-	-	-	1.1600	-	-	-	-	1.6400	-	-	-	-	-
027	1.400	-	-	-	-	-	-	-	1.6400	-	-	1.400	1.100	-	-	-	-	-	-
66	-	1.200	1.200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3200	-	-	-	-	1.800
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	1.400	1.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	1.400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.200	-	-	-	-	-	-	-
89	1.400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.400
539	1.800	-	-	-	-	-	-	-	1.3200	-	-	-	-	1.800	-	-	-	-	1.800
540	1.1600	1.200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
541	-	1.100	1.1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.800	-	-	-	-	-	-
542	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
543	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6400	-	1.800	-	-	-	-	-	-	-	-
544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
545	1.200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.400	-	-	-	-	-	1.3200
546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.100	-	-	-	-	-	-	-

Grupo: Tétanos n = 23

Serovariedades

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1T	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5T	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-
13T	-	1:100	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-
9A*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:100	-	-	-	-
14	-	-	1:400	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15A*	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
501	-	-	1:200	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
502	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-
503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:100	-	-	-	-	-
506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
508	-	-	1:800	1:100	1:100	-	-	-	-	-	-	1:100	-	1:200	1:100	-	-	-	-
509	1:100	1:400	-	1:200	-	-	-	1:100	-	-	-	1:100	1:200	-	1:100	-	-	-	-
510	-	-	1:100	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	1:800	1:3200	-	-	-	-	-
511	-	1:200	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	1:400	1:400	-	-	-	-	1:200	-	-	-	1:200	-	1:200	-	-	1:100	-
513	-	-	-	1:200	-	-	-	1:200	-	-	-	-	1:400	1:200	-	-	-	1:100	-
514	-	1:800	1:200	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-

Grupo: Viperino n = 35

Serovariedades

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
9	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:100	-	-	-	-	-	-
47*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-
63*	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:100	-	-	-	-	1:100	-	-
113	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5A	1:200	1:800	1:100	-	1:100	1:100	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	1:200	1:400	-	1:100
16A*	1:100	1:200	1:200	1:200	1:100	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	1:100	-	-	-	-
4V	-	-	1:100	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-
7V	1:200	1:100	1:100	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	1:200	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-
135	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-
136	1:100	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	1:100	1:200	-	1:100	-	-	-	-
549	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
550	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
551	1:400	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	1:100	-	-	-	-	-
552	1:200	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-
553	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	1:100	-	-	-	-
554	1:200	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-
555	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
556	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	1:200	-	-	-	-

557	1:400	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	
558*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400	-	1:100	1:200	-	-	-	
559	1:200	-	1:400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:1600	-	1:100	1:200	-	-	-	1:100
561	1:100	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
562	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
563	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Grupo: Animales no inmunizados, con edades menores de 4 años n = 6

#### Serovariedades

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
IA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.800	-	-	-	-	-	-	-
Ma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH	-	-	1:200	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	1:200	-	-	1:800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH	-	-	1:100	1:100	-	1:400	-	1:3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	-	-	-	1:100	-	1:200	-	-	-	-	-	1.800	-	-	-	1:100	-	-	-
BO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Serovarietades de *Leptospira interrogans* utilizadas como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica.

1.- <i>australis</i>	6.- <i>paidjan</i>	11.- <i>hebdomadis</i>	16.- <i>sejroae</i>
2.- <i>bratislava</i>	7.- <i>canicola</i>	12.- <i>icterohaemorrhagiae</i>	17.- <i>wolffi</i>
3.- <i>autumnalis</i>	8.- <i>celledoni</i>	13.- <i>pomona</i>	18.- <i>szwajizak</i>
4.- <i>castellonis</i>	9.- <i>cynopteri</i>	14.- <i>pyrogenes</i>	19.- <i>tarassovi</i>
5.- <i>bataviae</i>	10.- <i>gripotiphosa</i>	15.- <i>hardjo</i>	

\* Animales procedentes de establos lecheros.

Hembras