

January 2017

Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de Cundinamarca (Colombia)

Germán Rodríguez

Universidad de La Salle, gerodriguezm@unisalle.edu.co

Ricardo Piñeros

Universidad de La Salle, rjpineros@unisalle.edu.co

Germán Prada

Universidad de La Salle, geprada@unisalle.edu.co

César Díaz

Universidad de La Salle, ceadiaz@unisalle.edu.co

Carlos Venegas

Universidad de La Salle, cavenegas@unisalle.edu.co

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Rodríguez G, Piñeros R, Prada G, Díaz C, Venegas C, Salazar C, Trujillo C y Nossa LC. Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de Cundinamarca (Colombia). *Rev Med Vet.* 2017;(34): 93-100. doi: <https://doi.org/10.19052/mv.4258>

Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de Cundinamarca (Colombia)

Autores

Germán Rodríguez, Ricardo Piñeros, Germán Prada, César Díaz, Carlos Venegas, Carlos Salazar, Carlos Trujillo, and Laura Camila Nossa

Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de Cundinamarca (Colombia)

Germán Rodríguez¹ / Ricardo Piñeros¹ / Germán Prada¹ / César Díaz¹ / Carlos Venegas¹ / Carlos Salazar¹ / Carlos Trujillo¹ / Laura Camila Nossa²

Resumen

El propósito de este estudio fue detectar serológica (prueba de microaglutinación) y molecularmente (el ADN de *Leptospira* spp. por PCR convencional-reacción de la polimerasa en cadena) la exposición o presencia de *Leptospira* spp., a partir de muestras de suero sanguíneo, líquido preseminal y semen en caballos reproductores criollos colombianos representativos de esta raza, en 44 criaderos del departamento de Cundinamarca. En Colombia no existen estudios relacionados con la presencia de leptospiras en semen equino, y dentro de los planes sanitarios en esta especie no se vacuna contra esta enfermedad. Se evaluaron muestras de un total de 107 animales, escogidos por muestreo por conveniencia, de las cuales al analizar el suero fueron seroreactivas 35 (32,7%), correspondientes al serogrupo *Leptospira interrogans*, serovariedades Canícola, Pomona y Grippotyphosa. Se detectó el DNA de *Leptospira* spp., por PCR convencional en dos muestras de semen que representaron el 1,9% del total de muestras. Mediante la técnica de campo oscuro se encontraron en la mayoría de las muestras de líquido preseminal diferentes formas bacterianas, algunas de ellas compatibles con leptospira. También se observaron células de descamación, cristales y uratos. Adicionalmente, no se obtuvo aislamiento de la bacteria en el medio EMJH y no se detectó ADN mediante la técnica de PCR convencional a partir del líquido preseminal.

Palabras clave: campo oscuro, *Leptospira* spp., líquido preseminal, MAT, PCR, semen.

1 Grupo de Medicina y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá (Colombia). Centro de Investigaciones en Medicina y Reproducción Animal CIMRA.

✉ gerodriguezm@unisalle.edu.co, rjpineros@unisalle.edu.co, geprada@unisalle.edu.co, ceadias@unisalle.edu.co, cavenegas@unisalle.edu.co, caadsalazar@unisalle.edu.co, catrujillo@unisalle.edu.co, lnossa13@unisalle.edu.co.

2 Estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Universidad de La Salle.

✉

Molecular determination of *Leptospira* spp. in semen and pre-ejaculatory fluid, and serological study of Creole horses in the department of Cundinamarca (Colombia)

Abstract

The objective of this study was to serologically (microagglutination test) and molecularly—*Leptospira* spp. DNA by conventional polymerase chain reaction (PCR)—detect the exposition or presence of *Leptospira* spp. from blood, pre-ejaculatory fluid, and semen samples in Colombian Creole horses representative of this breed, in 44 breeding centers in the department of Cundinamarca. In Colombia, there are no studies related to the presence of leptospires in equine semen, and according to health plans designed for this species they are not vaccinated against this disease. Samples were collected from a total of 107 animals, selected by convenience sampling; after serum analysis, 35 were

Cómo citar este artículo: Rodríguez G, Piñeros R, Prada G, Díaz C, Vanegas C, Salazar C, Trujillo C, Noosa LC. Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de Cundinamarca (Colombia). Rev Med Vet. 2017;(34 Supl):93-100. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4258>

seroreactive (32.7%), corresponding to the *Leptospira interrogans* serogroup, serovars canicola, pomona, and grippotyphosa. *Leptospira* spp. DNA was detected by conventional PCR in two semen samples that represented 1.9% of the total samples. Using the dark-field technique, different bacterial forms were found in most of the pre-ejaculatory fluid samples, some of them compatible with *Leptospira*. Desquamated cells, crystals, and urates were also found. In addition, the bacterium was not isolated in the EMJH medium and no DNA was detected by the conventional PCR technique from the pre-ejaculatory fluid.

Keywords: dark-field technique, *Leptospira* spp., pre-ejaculatory fluid, MAT, PCR, semen.

Determinación molecular de *Leptospira* spp. em sêmen e líquido pré ejaculatório e estudo serológico de cavalos nativos no estado de Cundinamarca (Colômbia)

Resumo

O propósito deste estudo foi detectar serológica (exame de micro aglutinação) e molecular (o ADN de *Leptospira* spp. por PCR convencional-reação da polimerase em cadeia) a exposição ou presença de *Leptospira* spp., a partir de amostras de soro sanguíneo, líquido pré-ejaculatório e sêmen em cavalos reprodutores nativos colombianos representativos desta raça, em 44 criadouros do estado de Cundinamarca. Na Colômbia não existem estudos relacionados com a presença de leptospira em sêmen equino, e dentro dos planos sanitários nesta espécie não se vacina contra esta doença. Foram avaliadas amostras de um total de 107 animais, escolhidos por amostragem por conveniência, das quais ao analisar o soro foram soro reativas 35 (32,7%), correspondentes ao sorogrupo *Leptospira interrogans*, soro variedades Canícola, Pomona e Grippotyphosa. Foi detectado o DNA de *Leptospira* spp., por PCR convencional em duas amostras de sêmen que representaram o 1,9% do total de amostras. Por meio da técnica de campo escuro na maioria das amostras de líquido pré-ejaculatório foram encontradas diferentes formas bacterianas, algumas destas compatíveis com leptospira. Também se observaram células de descamação, cristais e uratos. Adicionalmente, não se obteve isolamento da bactéria no método EMJH e não se detectou ADN mediante a técnica de PCR convencional a partir do líquido pré-ejaculatório.

Palavras chave: campo escuro, *Leptospira* spp., líquido pré-ejaculatório, MAT, PCR, sêmen.

INTRODUCCIÓN

El presente artículo se refiere a la descripción de los hallazgos en exposición y presencia de *Leptospira* spp. de equinos criollos en criaderos de Cundinamarca (Colombia), a partir de muestras de semen, líquido preseminal y suero sanguíneo de reproductores. En los estudios realizados en equinos en Norteamérica la mayoría de

los abortos son causados por la *Leptospira interrogans*, serovariedad Pomona, pero también se encuentran involucradas la Grippotyphosa y Hardjo en regiones enzoóticas (1-3). La característica principal de la leptospirosis es su manifestación como zoonosis, que es la más difundida en el ámbito mundial, y está presente en todos los continentes excepto en la Antártica (4). Al ser una enfermedad global, representa un gran riesgo para

la salud pública y los sistemas de producción pecuarios (5). La prevalencia de leptospirosis en diferentes partes del mundo se debe principalmente a la infección renal crónica de una gran variedad de animales domésticos y mamíferos silvestres. La colonización de los túbulos renales proximales de los animales portadores lleva a la eliminación de la bacteria a través de la orina (5). Sin embargo, el hallazgo de ADN por PCR de *Leptospira interrogans*, serovariedades Bratislava y Pomona, en fluido vaginal de yeguas, sugiere la posibilidad de transmisión sexual (6-8). Solo se conocen dos registros de detección de ADN por PCR de *Leptospira* spp. en el semen de sementales (9,10).

En otras investigaciones se ha detectado la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en semen de ganado bovino, pequeños rumiantes y porcinos, lo que demuestra una posible transmisión de leptospirosis por contacto sexual (7,8). En equinos, una manifestación común de leptospirosis crónica es la presentación de uveítis recurrente y disminución en el rendimiento atlético; también se presentan fallas reproductivas, abortos debido a la infección intrauterina y muerte fetal (5,11,12), nacidos muertos, mortalidad neonatal y potros débiles al nacimiento (13,11).

El semen contaminado de sementales puede representar una fuente importante de transmisión, por lo cual el propósito de este estudio se orientó a la detección molecular por PCR y serología mediante la técnica de microaglutinación (MAT) de *Leptospira* spp. en sangre, fluido preseminal y semen de caballos criollos colombianos destinados a la reproducción, en Cundinamarca (Colombia), durante 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para este trabajo se seleccionaron 107 equinos por muestreo no aleatorio por conveniencia. Se trata de caballos criollos colombianos reproductores activos en monta directa y donantes de semen, ubicados en Cun-

dinamarca (Colombia), provenientes de 44 criaderos en regiones geográficas que se encuentran entre los 1800 y los 2800 m s. n. m. A cada criadero se le realizó una encuesta estructurada para recopilar información de factores asociados al riesgo de infección o a la presencia de *Leptospira* spp. Todos los caballos estaban vacunados contra encefalitis equina venezolana e influenza, y todos estaban sanos, sin signos de enfermedad clínica. En cuanto a la aplicación de vacunas polivalentes contra la leptospirosis, en ninguno de los predios se realiza dicha vacunación.

Muestras

Se recolectaron muestras de sangre, fluido preseminal y semen de los 107 caballos.

- Muestras de sangre. Las muestras de sangre (107) fueron tomadas por venopunción yugular en un volumen aproximado de 5 cm³ por animal, colectadas en tubos (Vacutainer®, BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA).
- Fluido preseminal. Las muestras de fluido preseminal (3-5 cm³ por animal) se colectaron antes de la toma de semen en tubos (BD Falcon Centrifuge Tubes, Franklin Lakes, USA) de 15 ml. Las muestras (107) fueron diluidas en medio SSAF 0.01 M, pH 7,2 en relación 1:1, para la realización de microscopía de campo oscuro, intentos de aislamiento y PCR en el laboratorio.
- Semen. Las muestras de semen (107) se colectaron utilizando una vagina artificial tipo Missouri con agua caliente a 50 °C y con presión interna de la vagina artificial, acorde a las necesidades del semental, con estimulación de yegua en celo y siguiendo un protocolo de asepsia adecuado. Se almacenaron 1,5 cm³ de semen en tubos Eppendorf de 2 ml para microcentrífuga. Las muestras fueron transportadas en refrigeración a 5 °C, en neveras de poliestireno expandido, del campo al Laboratorio de Cultivo Celular y Microbiología de la sede Norte de la Universidad de La Salle, en un lapso menor a 12 h, para posteriormente ser analizadas por PCR convencionalmente.

Las muestras de líquido preseminal se transportaron en cava a temperatura ambiente en un lapso de tiempo no mayor a 3 h para su procesamiento.

Serología

Para la detección de anticuerpos de la *Leptospira* spp. se utilizó la técnica de MAT en las distintas muestras de sangre (14,15). Las 107 muestras de suero sanguíneo fueron enfrentadas a los antígenos de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjoprajitno, *Leptospira interrogans* serovariedad Canícola, *Leptospira interrogans* serovariedad Grippothyphosa, *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae, *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona y *Leptospira interrogans* serovariedad Bratislava. (14). La prueba se realizó en el Laboratorio de Microbiología y las muestras se consideraron positivas cuando los títulos fueron $\geq 1:200$ según lo registrado por Hamond y colaboradores (10).

PCR convencional

Para la detección del genoma de la *Leptospira* spp. se utilizó la técnica de PCR convencional en las muestras de fluido preseminal y semen, para los genes hap 1 y rrl con 287 pb y 462 pb respectivamente (15). La extracción de material genético se hizo utilizando el Qiamp DNA Kit (Qiagen®), y la aplicación se realizó con Green Mix Master Tap polimerasa de Promega®, la cual se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con EZ-vision® de Promega. La prueba se realizó en el mismo laboratorio (15).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron por tablas de contingencia χ^2 y por OR con sus respectivos límites de confianza (Epi-Info 2000). El OR se ajustó por regresiones logísticas

con las variables presencia o ausencia de *Leptospira* spp. en las muestras analizadas. También se establecieron posibles asociaciones por rangos de Spearman (16).

RESULTADOS

Campo oscuro

La técnica de campo oscuro se ha utilizado desde hace muchos años como una herramienta diagnóstica importante en *Leptospira* spp. (1,17). Sin embargo, presenta problemas de especificidad por la presencia de artefactos con formas muy similares a la bacteria, las cuales pueden ser confundidas dando falsos positivos (12,16,18).

Se efectuó un análisis morfológico de las muestras de líquido preseminal, del cual se encontraron los resultados referentes al número de animales y a las fincas muestreadas. Dentro de los elementos encontrados, al visualizar particulados utilizando el campo oscuro a 450X, se observaron diferentes tipos de bacterias, seguidos de formas compatibles con leptospiros y cristales. Las muestras de líquido preseminal donde se encontraron formas compatibles con estructuras espirilares fueron procesadas posteriormente por la prueba de PCR convencional.

Serología

El 32,7% de las muestras presentó serorreactividad; se destaca que las serovariedades Canícola, Pomona y Grippothyphosa representaron el 74,3% de los resultados positivos. Los resultados de MAT se presentan en la tabla 1. Se resalta nuevamente que de las 35 muestras positivas fueron dominantes las serovariedades Canícola (13), Pomona (9) y Grippothyphosa (4).

Tabla 1. Resultados por títulos positivos a las serovariedades de *Leptospira* spp. (\geq 1:200)

Títulos	Hardjo	Pomona	Canícola	Icterohaem	Grippotyph	Bratislava	Total
1:200	2	5	9	2	3	3	24
1:400	1	3	2	1	0	0	7
1:800	0	1	2	0	0	0	3
1:1600	0	0	0	0	1	0	1
Total (+)	3	9	13	3	4	3	35

En la tabla 2 se observa que 10 de las muestras correspondieron a infecciones con un solo serotipo y en su orden de importancia: 4 correspondieron a la serovariedad Pomona, 3 a Canícola, 2 a Grippotyphosa y 1 a Hardjo.

En la tabla 3 se describe que en 19 muestras se presentaron resultados positivos a dos serovariedades; las

dominantes fueron las infecciones mixtas de las serovariedades Canícola-Grippotyphosa en 5 casos y las serovariedades Canícola-Pomona en 4 casos.

En la tabla 4 se describe que tres muestras de animales presentaron títulos positivos a tres serovariedades.

Tabla 2. Resultados por títulos positivos a una serovariedad de *Leptospira* spp. (\geq 1:200)

Títulos	Hardjo	Pomona	Canícola	Icterohaem	Grippotyph	Bratislava	Total
1:200	1	2	2	0	2	0	7
1:400	0	2	1	0	0	0	3
Total	1	4	3	0	2	0	10

Tabla 3. Resultados por títulos positivos a dos serovariedades de *Leptospira* spp. (\geq 1:200)

Títulos	H+C	H+P	H+G	C+G	C+P	C+I	C+B	G+I	I+B	Total
1:200	1	0	1	1	0	1	2	1	0	7
1:400	1	1	0	1	1	0	0	0	1	5
1:800	0	0	0	2	3	0	0	0	0	5
1:1600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
Total	2	2	1	5	4	1	2	1	1	19

Convención: H = Hardjo; C = Canícola; P = Pomona; G = Grippotyphosa; I = Icterohaemorrhagiae; B = Bratislava.

Tabla 4. Resultados por títulos positivos a tres serovariedades de *Leptospira* spp. (\geq 1:200)

Título	C+G+B	C+P+H	C+I+G	C+I+B	Total
1:200	1	1	1	0	3
Total	1	1	1	0	3

Convención: H = Hardjo; C = Canícola; P = Pomona; G = Grippotyphosa; I = Icterohaemorrhagiae; B = Bratislava.

PCR convencional

En el proceso de detección del genoma de *Leptospira* spp. en el transiluminador de las muestras de fluido preseminal y semen, se encontró formación de bandas con el gen rrl y 462 pb mientras que con el gen hap 1 con 287 pb no se visualizaron (15).

DISCUSIÓN

Los resultados serológicos encontrados sugieren la exposición de los sementales a *Leptospira* spp. sin que se manifieste condición clínica en ellos. Los resultados positivos de la PCR convencional en un 1,9% del total de las muestras precisan la existencia del ADN bacteriano. Sin embargo, generan la pregunta de si realmente ese material genético bacteriano procede del semen o se asocia a la presencia de leptospiras en el conducto uretral debido a que estos animales registraron serologías positivas. Estos resultados difieren de los hallados en otros estudios, en los que se encontró el 50% de positivos por PCR en muestras de sementales (10).

Se registra en este estudio que la mayor presentación de infecciones corresponde a *Leptospira interrogans* serovariedades Canícola y Pomona en un 62,8%. Pero llama la atención que en las tablas 1 a 4 siempre se presenta mayor reactividad a la serovariedad Canícola seguida por Pomona y *Gryppotyphosa*.

Considerando que la detección del genoma de leptospira mediante la utilización de la técnica de PCR convencional en el semen y el líquido preseminal fue muy baja en los predios muestreados, se ha estimado como una prueba en este caso de alto valor diagnóstico. Pero la presencia de anticuerpos contra este agente sugiere que los animales positivos han estado expuestos y su localización podría encontrarse en el riñón, lo cual coincide con los estudios sobre la patogénesis de las infecciones en las especies animales. Particularmente en un predio donde se encontraron títulos positivos por la técnica de MAT y positivos a PCR convencional se registraron ca-

sos de abortos, que fueron tratados como casos de leptospirosis.

Haciendo una aproximación anatómica de la uretra de los machos equinos donde puede existir la posibilidad de contaminación del semen, se sugiere la siguiente consideración: para establecer el análisis es importante describir la uretra intrapelviana del equino; se origina en la vejiga urinaria, a partir del orificio urinario interno, y termina en el istmo uretral a la altura del arco isquiático, cerca de las glándulas bulbo uretrales, para continuar con la uretra extrapelviana. En dicha porción pelviana de la uretra se abren los conductos de las glándulas genitales accesorias (próstata, vesículas seminales y bulbo uretrales) y los eyaculatorios; también es el punto que comunica la vejiga urinaria (meato urinario interno). El otro componente es el colículo seminal (*Colliculus seminalis*, utrículo prostático, *Veru montanum*), una estructura anatómica lisa, oval, que se proyecta dorsoventralmente a la luz de la uretra intrapelviana, caudal a la cresta uretral muy cerca al meato urinario interno. Consta de dos orificios eyaculatorios donde llegan los conductos de las vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes, donde drenan su secreción; a cada lado se abren los orificios prostáticos. Caudalmente cerca al arco isquiático el diámetro de la uretra disminuye ligeramente; craneal a esta se abren los conductos de las glándulas bulbouretrales a lado y lado de la pared uretral.

El aparato muscular se puede denominar de esta manera, dado que actúa sinérgicamente para el proceso de la micción desde la vejiga urinaria hasta la uretra, y en la eyaculación, con el bloqueo del meato urinario interno y el *Veru montanum*. Su acción final es bloquear el paso de la orina en el momento de la eyaculación y asegurar la mezcla de las secreciones de las glándulas genitales accesorias y los espermatozoides en la uretra pelviana. El contacto directo con la uretra e indirecto con la vejiga y el trigono vesical a través del poro urinario interno genera un factor de riesgo de infección ascendente o sistémica de las glándulas, como en el caso de las vesiculitis infecciosas. Adicionalmente, una disfunción

neuromuscular podría alterar la acción eficiente de los orificios eyaculatorios y del cierre efectivo del meato urinario interno, el cual podría generar contaminación del semen con orina.

Aunque no existen informes de equinos particulares de estas presunciones anteriores, ofrece un buen campo y preguntas de investigación y particularmente en casos de infección por leptospira que son raros de presentación en semen. La exposición de reproductores a hembras infectadas con leptospira podría ser causa predisponente y determinante en encontrar genomas de leptospira y presencia de leptospira cualitativa en MAT (19).

La presentación de *Leptospira* spp. puede ser variada según la zona geográfica y tipo de sistema productivo equino. En el caso particular de la investigación no se encontró un índice alto de infección por la reproducción en las zonas de estudio donde fueron predominantes *Leptospira interrogans*, serovariedades Canícola, Pomona y Grippytyphosa. Esto es diferente a lo hallado por Divers y Chang (1), quienes describen que en Norteamérica la mayoría de los abortos son causados por el serovar Pomona, pero también se encuentran involucradas la Grippytyphosa y Hardjo en regiones enzooticas. En el caso del serovar Bratislava, registran que su aislamiento afecta en los equinos los casos de uveítis y abortos (5,20,21).

CONCLUSIONES

Los resultados serológicos encontrados sugieren la exposición de los sementales a *Leptospira* spp. sin que se manifieste condición clínica en ellos. Los resultados positivos de la PCR convencional en un 1,9% de total de las muestras precisan la existencia del ADN bacterial; sin embargo, generan la pregunta de si realmente ese material genético bacteriano procede del semen o se asocia a la presencia de leptospiras en el conducto ure-

tral, debido a que estos animales registraron serologías positivas. Estos resultados difieren de los hallados en otros estudios, en los que se ha encontrado el 50% de positivos por PCR en muestras de sementales.

Se afirma en el presente estudio que en la mayor presentación de infecciones, de los casos positivos, el 74,3% corresponde a la *Leptospira interrogans*, serovariedades Canícola, Pomona y Grippytyphosa. La alta tasa de animales con cultivos positivos a *Leptospira* spp., y con resultados negativos a PCR convencional del gen rrl, puede ser debido a:

- Presencia de inhibidores de la Taq-polimerasa en las muestras purificadas de ADN.
- Baja concentración de la bacteria, que no permite la amplificación por la técnica de PCR pero sí el crecimiento en cultivos en medio EMJH, pero con tiempos superiores a los dos meses de cultivo.

Teniendo en cuenta que la detección del genoma de leptospira mediante la utilización de la técnica de PCR en el semen y el líquido preseminal fue muy baja en los predios muestreados, se considera esta técnica como una prueba de alto valor diagnóstico para este caso. Pero la presencia de anticuerpos contra este agente sugiere que los animales positivos han estado expuestos y su localización podría encontrarse en el riñón, lo cual coincide con los estudios sobre la patogénesis de las infecciones en las especies animales. Particularmente en un predio donde se encontraron títulos positivos por la técnica de MAT y positivos a PCR, se registraron casos de abortos que fueron tratados como casos de leptospirosis.

La presentación de *Leptospira* spp. puede ser variada según la zona geográfica y el tipo de sistema productivo equino. En el caso particular de investigación no se encontró un índice alto de infección por medio de la reproducción, ni ocular (uveítis), en la zona de estudio donde fueron predominantes *Leptospira interrogans*, serovariedades Canícola, Pomona y Grippytyphosa.

REFERENCIAS

1. Divers Th, Chang Y. Leptospirosis. En Robinson N, Sprayberry K, editors. Current therapy in equine medicine. Ed Norman Robinson and Kim Sprayberry. 6a. ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2009. p. 145-147.
2. Munroe G, Scott J. Equine clinical medicine surgery and reproduction. Boca Raton FL: CRC Press.
3. Aleman M. Leptospirosis equine. En Bradford S, editor. Medicina interna de grandes animales. 4a. ed. Amsterdam: Elsevier; 2010. p. 1161.
4. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* spp. and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140:287-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
5. Verma A, Stevenson B, Adler B. Leptospirosis in horses. Vet Microbiol. 2013;167:61-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>
6. Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros M, Bourhy P, Lilenbaum W. Predominance of *Leptospira* spp. interrogans serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. Anim Reprod Sci. 2014;151(3-4):275-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.019>
7. Hodgins EC, Miller DA, Lozano F. *Leptospira* abortion in horses. J Vet Diagn Invest. 1989;1:283-7. <https://doi.org/10.1177/104063878900100401>
8. Hamond C, Pestana CP, Rocha-de-Souza CM, Cunha LE, Brandão F, Medeiros MA, Lilenbaum W. Presence of leptospirae on genital tract of mares with reproductive problems. Vet Microbiol. 2015;179(3-4):264-9.
9. Scarcelli E, Genovez ME, Piatti RM, Girio RJS, Cardoso MV, Miyashiro S. *Leptospira* spp. detected by polymerase chain reaction (PCR) in semen of stallion PSI. Arq Inst Biol. 2001;68:77.
10. Hamond C, Martins G, Medeiros M, Lilenbaum W. Presence of leptospiral DNA in semen suggests venereal transmission in horses. J Equine Vet Sci. 2013;33(12):1157-9. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.185>
11. Rohrbach B, Ward D, Hendrix D, Cawrse-Foss, Moyers T. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent eye. Vet Ophthalmol. 2005;8(3):171-9. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00367.x>
12. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003;3(12):757-71. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
13. Schmeling MF, Arn E, De Marco PL, Vinasco NB. Utilidad del serodiagnóstico de leptospirosis en equinos aparentemente sanos. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias. 2009;8(2):55-60.
14. Sotomayor C, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, Ramírez M, Rojas M, Rivera H. Seroprevalencia de anticuerpos contra serovares de *Leptospira* spp. en yeguas de un haras de la ciudad de Lima. Rev Investig Vet Perú. 2012;23(4):499-503. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i4.970>
15. Hernández-Rodríguez P, Díaz C, Dalmau E, Quintero G. A comparison between Polymerase Chain Reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. J Microbiol Methods. 2011;84(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.021>
16. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. Iowa: Blackwell Publishing; 2007.
17. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med Mal Infect. 2013;43(1):1-9.
18. Medrano C, Díaz C, Dalmau E. Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá. Rev Med Vet. 2011;(21):133-45.
19. Venegas C. Comunicación personal. Profesor de Anatomía. Universidad de La Salle; 2015.
20. Santschi E, Vaala E. Identification of the high-risk. Pregnancy. En: McKinnon A, Squires E, Vaala W, Varner D, editores. Equine reproduction. 2a. ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2011.
21. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Firtzpatrick ES, Fanning S. Veterinary microbiology and microbial diseases. Iowa: Wiley-Blackwell; 2011.