

Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública

Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health

Carlos Alfredo Carmona-Gasca* Lemuel León Lara** Luz Olivia Castillo-Sánchez*
José Manuel Ramírez-Ortega* Albert Ko*** Carlos Luna Palomera†
Alejandro de la Peña-Moctezuma*

Abstract

Bovine leptospirosis causes high economic losses in cattle mainly due to reproductive failure, as well as representing public health risk. Since the last century, antibody titers against several *Leptospira* serovars have been detected by the microscopic agglutination test (MAT) in Mexico. With the exception of very few cases, the presence of serovars causing leptospirosis in cattle and other animal species has not been demonstrated by isolation in Mexico, and in such cases characterization had to be done abroad by complex and slow immunological approaches, by comparison with a number of reference strains. The present study was conducted to perform the molecular characterization of *Leptospira* isolates by multiple locus sequencing typing (MLST). A hundred and ninety seven sera and kidneys samples were collected immediately after slaughter, from grazing cattle coming from the south-eastern states of Mexico. Anti-*Leptospira* antibodies were detected by the MAT and kidneys were inoculated into EMJH and Fletcher's specific medium. A seropositivity of 60.4% (119 out of 197), with titers from 1:100 up to 1:3 200 was detected. Four isolates (2.03%), referred as CAL4, CAL6, CAL7 and MOCA45, were characterized by serology, ribotyping and MLST as *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa; *L. interrogans* serovar Hardjo; *L. santarosai* serovar Mini and *L. santarosai* serovar Tarassovi, respectively. With the exception of serovar Hardjo, the three other isolates belong to serovars and species not previously isolated in Mexico. These findings make it necessary to evaluate the potential distribution of such serovars among cattle and their role on animal production and public health.

Key words: LEPTOSPIRA, TARASSOVI, MINI, GRIPPOTYPHOSA, CATTLE, ISOLATION, MLST.

Resumen

La leptospirosis bovina causa grandes pérdidas económicas a la ganadería por problemas reproductivos y también es un riesgo de salud pública. En México, desde el siglo pasado se ha registrado la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira* por la técnica de aglutinación microscópica (AM), en bovinos y otras especies animales. En muy pocos casos, la enfermedad fue demostrada por el aislamiento de *Leptospira*, y en tales casos, su caracterización se basó en métodos inmunológicos lentos que requirieron la comparación con cepas de referencia y que fueron realizados fuera de México. En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular mediante la secuenciación de locus múltiples (MLST), de aislados de *Leptospira* obtenidos de riñones de bovinos recolectados en rastro, procedentes de las zonas Golfo y sur de México. Se obtuvieron muestras de suero y riñones de 197 bovinos para realizar la AM, y el cultivo en medios específicos EMJH y Fletcher. Se detectó una seropositividad del 60.4% (119 de 197), con títulos desde 1:100 hasta 1:3,200 y se obtuvieron cuatro aislados de *Leptospira* (2.03%), denominados CAL4, CAL6, CAL7 y MOCA45. Los aislados fueron caracterizados por serología, ribotipificación y MLST, como *L. kirschneri* serovariedad Grippotyphosa; *L. interrogans* serovariedad Hardjo; *L. santarosai* serovariedad Mini y *L. santarosai* serovariedad Tarassovi, respectivamente. A excepción de la serovariedad Hard-

Recibido el 7 de octubre de 2010 y aceptado el 31 de mayo de 2011.

*Grupo de Investigación en Leptospira y Leptospirosis, Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

***Weill Cornell Medical College and Oswaldo Cruz Foundation/Brazilian Ministry of Health, Rua Waldemar Falcao, 121-Brotas 40.295-001-Salvador, Brazil, BA.

†Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Teapa, km 25, La Huasteca 2a. sección, Villahermosa, Tabasco, México.

Este manuscrito es parte del trabajo de tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal del primer autor.

Responsable de correspondencia: Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, correo electrónico: delapema@unam.mx

Palabras clave: LEPTOSPIRA, TARASSOVI, MINI, GRIPPOTYPHOSA, BOVINOS, AISLAMIENTO, MLST.

Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic species and serovars of *Leptospira*.¹ In cattle, leptospirosis is a disease that affects milk as well as beef production units.² Commonly, infection is subclinic when it is caused by bovine adapted serovars, such as serovar Hardjo; but fever, haematuria, haemoglobinuria, jaundice and eventually death of young individuals might be seen when infection is due to non host adapted serovars. Abortion might be seen in any pregnancy stage, as well as stillbirth occurrences, weak newborns, fall in milk production, transitory agalactia and infertility.³ It is difficult to estimate the economic losses caused by leptospirosis, mainly by the difficulty in the establishment of a precise diagnostic, as well as by presence of other bacterial, viral and parasitic diseases with similar clinical signs.⁴

The first description of this disease in cattle was done by Mikhin and Azinov in Russia in 1935;⁵ in Australia by Johnson in 1943⁶ and in United States by Jungherr in 1944.⁷ Later, leptospirosis cases were identified practically around the world, where the most commonly recorded serovars have been Grippotyphosa, Pomona,⁸ Icterohaemorrhagiae,⁹ Hebdomadis,¹⁰ Sejroe¹¹ and Hardjo.¹² Hardjo has been recognized as a worldwide distributed serovar and the most important in cattle and other ruminants.¹³ In addition, two subtypes have been described in serovar Hardjo that belong to two different species: subtype Hardjobovis of *L. borgpetersenii* is important in Europe, North America and Australasia and subtype Hardjoprajitno of *L. interrogans* that has been found mainly in the American continent.¹⁴

The evidence of the presence of *L. interrogans* serovar Hardjo (Hardjoprajitno) isolated from a bovine fetus has been documented only once in Mexico.¹⁵ Being that isolation of *Leptospira* is a time consuming process of week or even months, routine diagnosis is based on the microscopic agglutination test (MAT), which detects antibodies against reference strains representing different serogroups.¹⁶ Different serological survey studies in cattle have found antibodies mainly against serovar Hardjo, followed by: Grippotyphosa, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae and Bratislava.^{17,18} This is only the result of vaccine or field acquired antibodies reacting against serovars used for diagnosis; however, there is still a lack of information about endemic *Leptospira* serovars infecting cattle in Mexico, this task

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por especies y serovariedades patógenas del género *Leptospira*.¹ En el ganado bovino, es una enfermedad que afecta a las unidades de producción tanto lecheras como de carne.² La infección suele ser subclínica cuando es causada por serovariedades adaptadas al bovino como la serovariedad Hardjo, o bien por serovariedades no adaptadas, se pueden manifestar signos como fiebre, hematuria, hemoglobinuria, ictericia y muerte en los animales jóvenes; mientras que en hembras gestantes se pueden presentar abortos en cualquier estadio de la gestación, mortinatos, nacimiento de animales débiles, decremento en la producción láctea, agalactia transitoria, así como infertilidad.³ Resulta difícil estimar las pérdidas económicas causadas por la leptospirosis, en gran parte por la dificultad para realizar el diagnóstico preciso y también debido a la presencia de otras enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que pueden cursar con los mismos signos.⁴

Los primeros estudios de esta enfermedad en bovinos fueron realizados por Mikhin y Azinov en Rusia en 1935;⁵ en Australia, en 1943 por Johnson,⁶ y en Estados Unidos, en 1944 por Jungherr;⁷ posteriormente se fueron identificando casos en prácticamente todo el mundo, donde las serovariedades más comúnmente registradas han sido Grippotyphosa, Pomona,⁸ Icterohaemorrhagiae,⁹ Hebdomadis,¹⁰ Sejroe¹¹ y Hardjo.¹² Esta última serovariedad ha sido reconocida como de distribución mundial y la más importante en el ganado bovino y en otros rumiantes.¹³ Además, en la serovariedad Hardjo se han reconocido dos subtipos clasificados en dos especies distintas: el subtipo Hardjobovis de *L. borgpetersenii* tiene importancia en Europa, América del Norte y Oceanía y el subtipo Hardjoprajitno de *L. interrogans* se encontró principalmente en el continente americano.¹⁴

En México, a la fecha sólo existe evidencia documentada de la presencia de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno), la cual fue inicialmente aislada a partir de un feto de bovino.¹⁵ Debido a que el aislamiento de *Leptospira* es un proceso lento que puede consumir de semanas hasta meses, el diagnóstico rutinario se basa en la prueba serológica de aglutinación microscópica (AM), donde se detectan anticuerpos contra cepas de referencia, representantes de diferentes serogrupos.¹⁶ En diferentes estudios serológicos

requires demonstration by isolation and characterization. It is assumed that other *Leptospira* species and serovars still not identified might be causing disease in cattle, causing economic losses and becoming a public health risk. For this reason, it is convenient to identify the distribution of the serovars that might be established in a specific geographical area. In this work, a serological survey and a bacteriological scrutiny followed by immunological and molecular characterization of the *Leptospira* isolates were done to identify species and serovars other than previously reported in the Gulf coast and Southern of Mexico.

Material and methods

Collection and processing of samples

Kidneys and sera samples from 197 bovines slaughtered for marketing were collected. For decontamination, kidneys were freed from their capsule and placed in a 0.025% benzalkonium chloride solution for 5 to 10 minutes. Afterwards, the kidneys were dried out with sterile paper towels and were longitudinally excised in aseptic conditions. With a sterile scraper, the kidney interior tissue was macerated and then inoculated in liquid EMJH (Ellinghausen, McCulloch, Johnson and Harris) and Fletcher's semisolid medium. Three ten-fold dilutions were done in such medium. Cultures were incubated at 30 °C for three months and observed weekly under dark field microscopy, searching for spirochetes. Sera samples were obtained by centrifugation at 903 g/for 5 min and kept frozen at -20 °C until the MAT was done.

Detection of anti-*Leptospira* antibody

The MAT was done with an initial 1:50 serum dilution in phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2 - 7.4), using as a positive cut off 1:100 sera dilutions.¹⁶ Seven to 14 days old liquid cultures in EMJH medium of twelve reference strains of serovars: Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona, Pyrogenes and Tarassovi were used for antibody detection. Strains were donated by the WHO/FAO/OIE-Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region, Brisbane, Queensland, Australia.

Serological identification of isolates

Specific immune sera were produced in 1.5 kg rabbits, using seven to 10 days old Fletcher's semisolid me-

en bovinos se han encontrado anticuerpos principalmente contra la serovariedad Hardjo, seguida de otras serovariedades, como Grippotyphosa, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Bratislava.^{17,18} Lo anterior sólo refleja que los anticuerpos vacunales o de campo reaccionan contra las serovariedades utilizadas para el diagnóstico, pero existe un vacío de información sobre las serovariedades de *Leptospira* que son endémicas y que verdaderamente infectan a los bovinos en México, lo que requiere de su demostración mediante el aislamiento y caracterización. Se presume que otras especies y serovariedades de *Leptospira* pudieran estar causando enfermedad en los bovinos, pero que a la fecha no han sido identificadas y pudieran llegar a ser un problema económico en las unidades de producción, así como para la salud pública. Es conveniente conocer la distribución de las serovariedades que se encuentran en un área geográfica determinada, por lo que en el presente trabajo se realizó inicialmente un escrutinio serológico y bacteriológico, y posteriormente la caracterización inmunológica y molecular de los aislados para identificar otras especies y serovariedades de *Leptospira* presentes en las zonas del Golfo y sur de México.

Material y métodos

Recolección y procesamiento de muestras

Se recolectaron muestras de riñón y sangre de 197 bovinos sacrificados para el abasto. Los riñones libres de la cápsula se colocaron en una solución de cloruro de benzalconio al 0.025% de 5 a 10 minutos, para descontaminar su superficie. Posteriormente, se secaron con toallas de papel estériles y se les practicó de forma aséptica un corte longitudinal; se obtuvo entonces un macerado del interior del órgano con un rallador estéril, el cual se inoculó en los medios EMJH (Ellinghausen, McCulloch, Johnson y Harris) y Fletcher semisólidos, realizando tres diluciones decuples. Los cultivos se incubaron a 30°C durante tres meses y se revisaron semanalmente por microscopía de campo oscuro, para detectar formas bacterianas compatibles con leptospiras. Los sueros fueron clarificados por centrifugación a 903 g/5 min y se mantuvieron a -20°C hasta realizar la prueba de AM.

Detección de anticuerpos anti-*Leptospira*

La prueba se realizó usando una dilución inicial del suero de 1:50 en solución amortiguadora de fosfatos (SAF, pH 7.2 a 7.4) y tomando como punto de corte para reacciones positivas la dilución de 1:100.¹⁶ Se utilizaron 12 cepas de referencia de las serovariedades

dium cultures of the purified isolates incubated at 30 °C. *Leptospire*s were collected from the growth zone known as the Dinger ring and were inactivated at 56 °C for 30 minutes. Inactivated cultures were then inoculated intravenously in 1, 2, 4, and 6 ml, in each one of two rabbits at one week intervals.¹⁶ Rabbits with a 1:12,800 serum antibody titer against the homologous strain, were anesthetized with 60 mg/kg of ketamine before being bled by cardiac puncture. Sera were obtained by centrifugation at 903 g for 5 minutes, distributed in 1.5 ml aliquots and kept frozen at -20 °C until they were used in the MAT. This test was done using the protocol previously described by Myers,¹⁶ with the rabbit immune sera and the reference strains.

DNA extraction and polymerase chain reaction

Laboratory adapted isolates were cultured in 100 ml EMJH medium and centrifuged at 10 000 g for 30 min. DNA extraction was done by the guanidine thiocyanate and chloroform-isoamyl-alcohol protocol previously described by Boom *et al.*¹⁹ A PCR was run in order to confirm whether the isolates were pathogenic or not. PCR used the primers G1 : G2 that amplify DNA of different pathogenic *Leptospira* species; and primers B64-I : B64-II that amplify serovars of the species *L. kirschneri*.²⁰ In addition, primers MILL1801 and MILL1802, were designed specially to amplify a DNA fragment of 1 289 bp, out from the *rfb* locus, codifying the lipopolysaccharide biosynthetic enzymes, from non-pathogenic serovars.²¹ Amplicons resulting from PCR were visualized in ethidium bromide stained agarose gels, and registered photographically with an image analyzer (Gel Logic 200, Kodak®).*

Genetic identification by sequencing the *rrs2* (16S ribosomal DNA)

The 16S rRNA gene from the isolates was sequenced at the Fio-Cruz Institute, in Salvador, Brazil. Sequences were submitted electronically and then edited and analyzed with the Sequencher®** version 4.6 package. Sequences homologies were detected in the database with the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn), available at the web.²² Alignment of the sequences and the resulting phylogenetic tree were constructed using the Neighbor-Joining method with 2,000 replicates with the 2-parameters Kimura model, in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 package.^{23,24}

Conversely, the first MLST scheme described by Ahmed *et al.*,²⁵ was used for typification of the isolates. Such a scheme was designed for typification of strains

Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona, Pyrogenes y Tarassovi cultivadas en medio EMJH líquido de 7 a 14 días, las cuales fueron donadas por el WHO/FAO/OIE-Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region, de Brisbane, Queensland, Australia.

Identificación serológica de los aislados

Se produjeron sueros inmunes en conejos de 1.5 kg de peso a partir de los aislados cultivados en medio de Fletcher de 7 a 10 días a 30°C. Los cultivos se recolectaron del anillo de desarrollo conocido como zona de Dinger, se inactivaron a 56°C durante media hora y posteriormente, se inocularon por vía intravenosa en dosis de 1, 2, 4, y 6 ml, con una semana de diferencia entre cada inóculo.¹⁶ Los conejos que alcanzaron títulos séricos mínimos de 1:12,800 contra la cepa homóloga con la que fueron inoculados, fueron anestesiados con ketamina (60 mg/kg) y sangrados en blanco por punción cardíaca. Los sueros se obtuvieron por centrifugación a 903 g/5 min, distribuidos en volúmenes de 1.5 ml y congelados a -20°C hasta su análisis. La prueba de AM se realizó utilizando el protocolo previamente descrito por Myers,¹⁶ con los sueros inmunes y las cepas de referencia.

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Los aislados adaptados a condiciones de laboratorio fueron cultivados en 100 ml de medio líquido EMJH y centrifugados a 10,000 g/30 min. La extracción de ADN se realizó por el método de tiocianato de guanidina y cloroformo-alcohol isoamílico descrito por Boom *et al.*¹⁹ Con la finalidad de confirmar el origen de los aislados, se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los iniciadores G1: G2 que amplifican ADN de serovariedades de diferentes especies patógenas de *Leptospira*, y con B64-I: B64-II, iniciadores que amplifican serovariedades de *L. kirschneri*.²⁰ También se utilizaron los iniciadores MILL1801 y MILL1802, diseñados especialmente para amplificar un fragmento de ADN de 1,289 pb, de una región del loci *rfb* codificante de enzimas para la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS), de serovariedades no patógenas.²¹ Los amplicones resultantes de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, para obtener un registro fotográfico mediante un digitalizador de imágenes (Gel Logic 200, Kodak®).*

*Carestream Health, Inc. Nueva York, Estados Unidos de América

from six pathogenic species of *Leptospira*, based on the analysis of the *adk*, *secY*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41* and *rrs2* allele sequences. PCRs were done with the following conditions: 200 μ M dNTPs, 0.2 U Taq polymerase, 5 μ l 10X PCR buffer (Roche®),*** 10 pmol each primer (synthesized at the Instituto de Biotecnología, UNAM) and 30 to 60 ng of DNA. Reactions were done in a 50 μ l final volume and run in a Perkin Elmer 2400 Gene Amp PCR System® Thermal Cycler, using the following protocol: an initial denaturalization step at 95°C/5 min, followed by 35 cycles of denaturalization (94 °C/30 sec), alignment (58 °C/45 sec) and extension (72 °C/45 sec), and a final extension step at 72°C/7 min. PCR products were separated in ethidium bromide stained 1% agarose gels by electrophoresis, visualized by UV light and photographically recorded. Before sequencing, PCR products were purified using the PCR Montagé®† columns. Electronically submitted sequences were analyzed and edited with the Sequencer® version 4.6 package. In order to designate the allele number for each gene, the obtained sequences from each isolate were compared with the DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) package, using a database provided by Ahmed *et al.*²⁵ The allele's phylogenetic analysis was done with the START2 package (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests version 2). Finally, the phylogenetic tree was corroborated with the analysis of a concatenated sequence obtained by joining the sequences of each gene, using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 4.2 package.²⁴

Results

Microscopic agglutination test of bovine sera

In the MAT, positive sera were found at a frequency of 60.40% of bovines sampled (119 out of 197), the more frequently detected *Leptospira* serovars were: Hardjo 39.90% (61/197), Tarassovi 7.10% (14/197), Pomona 3.04% (6/197), Grippotyphosa 1.52% (3/197), Icterohaemorrhagiae 1.52% (2/197), Bratislava 1.52% (2/197) and Canicola 0.50% (1/197).

Isolation and serological identification of isolates

After 12 to 13 weeks of incubation in EMJH liquid medium, four isolates were obtained from bovine kidneys (2.3%). Isolates were designated as CAL4, CAL6, CAL7 and MOCA45. Homologue sera reacted as follows: serum against the isolate CAL4 gave a 1:25,600

Identificación genética por secuenciación del gen *rrs2* (16S ribosomal)

El gen 16S rRNA de los aislados fue secuenciado en los laboratorios del instituto Fio-Cruz, Salvador, Brasil; las secuencias fueron remitidas electrónicamente a nuestro laboratorio donde fueron editadas, ordenadas y analizadas con el programa Sequencer®,* versión 4.6. Se identificaron las secuencias relacionadas en las bases de datos utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn), disponible en la red.²² El alineamiento de las secuencias y el árbol filogenético resultante fueron construidos utilizando el método de Neighbor-Joining con 2,000 réplicas con el modelo de Kimura de 2-parámetros, en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), versión 4.0.^{23,24}

Por otro lado, se utilizó el primer esquema de MLST, descrito por Ahmed *et al.*,²⁵ diseñado para la tipificación de cepas de 6 especies patógenas de *Leptospira*, el cual está fundamentado en el análisis de las secuencias de alelos de los genes *adk*, *secY*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41* y *rrs2*. Las PCR se realizaron de acuerdo con las siguientes condiciones: 200 μ M de dNTP's, 0.2 U de Taq Polimerasa, 5 μ l de amortiguador 10X (Roche®),** 10 pmol de iniciadores (sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM) y 30 a 60 ng de ADN, en un volumen total de reacción de 50 μ l. Para el proceso se utilizó un termociclador (Perkin Elmer 2400 PCR System®,*** con los parámetros de: desnaturalización inicial a 95°C/5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización (94°C/30 seg), alineación (58°C/45 seg) y extensión (72°C/45 seg), y una extensión final de 7 min/72°C. Para visualizar los productos se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La purificación de los amplicones antes de su secuenciación, se realizó utilizando columnas para purificar productos de PCR Montagé®,† Las secuencias remitidas electrónicamente fueron editadas y analizadas con el programa Sequencer®, versión 4.6. Para designar el número de alelos encontrados por gen, las secuencias obtenidas de cada aislado fueron comparadas con una base de datos proporcionada por Niyaz Ahmed *et al.*,²⁵ con el programa DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution).²⁶ Para realizar el análisis filogenético por alelos se utilizó el programa START2 (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests, Versión 2). Finalmente, el análisis filogenético se corroboró con las secuencias de cada gen concatenadas en una sola,

*Gene Codes Corporation. Brighton, Inglaterra.

**Roche Applied Science. Mannheim, Alemania.

***Millipore Corporation. MA, Estados Unidos de América.

†Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur.

titer to serovar Grippotyphosa strain Moskva V; serum against the isolate CAL6 gave a 1:25,600 titer to serovar Hardjo subtype Hardjoprajitno; serum against the isolate CAL7 gave a 1:12,800 titer to serovar Mini strain Sari; and finally, serum against the isolate MOCA45 gave a 1:12,800 titer to serovar Tarassovi strain Perepelitsin (Table 1).

Molecular identification of isolates

PCR showed the four isolates as pathogenic leptospires. A 565 bp DNA fragment was amplified from the CAL4 isolate with the B64-I : B64-II set of primers; meanwhile, a 283 bp DNA fragment was amplified from the isolates CAL6, CAL7 and MOCA45 with the G-1 : G-2 set of primers. None of the isolates showed PCR amplified DNA fragments with the MILL1801 - MILL1802 set of primers, which are specific for saprophyte non-pathogenic leptospires (Figure 1).

Accordingly to the phylogenetic analysis of the *rrs2* gene, the four isolates were classified in three different species of *Leptospira*. Comparing the sequences similarities with the Megablast package (www.megablast.ncbi.org), it was found that CAL4 has a 99% identity with sequences of other *L. kirschneri* serovars; CAL6 has a 99% identity with sequences of *L. interrogans* serovars; CAL7 and MOCA45 have a 99% identity with sequences of *L. santarosai* serovars.

Phylogenetic relationship among the isolates is shown in Figure 2.

MLST was done by PCR amplification and sequence comparison of internal amplicons of the proposed 6 genes, with the provided database. Every amplicon was sequenced in both directions. CAL6 showed the sequencing type number (ST) 254; such a ST is shared with *L. interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjoprajitno. Interestingly, isolates CAL4, CAL7 and MOCA45 showed ST numbers with no match in the database (Table 2).

Discussion

Clinical manifestation of leptospirosis in cattle is influenced by the infecting serovar and species. There are serovars adapted to cattle causing sporadic disease; non-adapted serovars that might cause acute outbreaks, and other uncommon serovars in cattle which clinical manifestations are unknown.²⁷ Control of leptospirosis depends, partially, in serological detection of serovars prevalent in the region and even better, based on their isolation. In this work, the first description of the molecular characterization of four bovine isolates of *Leptospira* from the species *L. interrogans*, *L. kirschneri* and two *L. santarosai*, isolated in Mexico is carried out.

con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.2.²⁴

Resultados

Aglutinación microscópica de los sueros de bovino

Se detectó una frecuencia de sueros positivos de 60.40% en los bovinos muestreados (119 de 197) mediante AM, donde las serovariedades de *Leptospira* detectadas con mayor frecuencia fueron: Hardjo 39.90% (61/197), Tarassovi 7.10% (14/197), Pomona 3.04% (6/197), Grippotyphosa 1.52% (3/197), Icterohaemorrhagiae 1.52% (2/197), Bratislava 1.52% (2/197) y Canicola 0.50% (1/197).

Aislamiento e identificación serológica de los aislados

Se obtuvieron cuatro aislados (2.3%), a partir de los riñones de bovino, entre las semanas 12 y 13 de incubación en medio EMJH. Los aislados se denominaron CAL4, CAL6, CAL7 y MOCA45. Al realizar la identificación con el suero inmune homólogo, el suero del aislado CAL4 reaccionó con un título de 1:25,600 contra la serovariedad Grippotyphosa cepa Moskva V; el aislado CAL6 reaccionó con un título de 1:25,600 contra la serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno; el aislado CAL7 reaccionó con un título de 1:12,800 contra la serovariedad Mini cepa Sari y el aislado MOCA45 reaccionó con un título de 1:12,800 contra la serovariedad Tarassovi cepa Perepelitsin (Cuadro 1).

Identificación molecular de los aislados

La PCR mostró a los cuatro aislados como leptospirosis patógenas. CAL4 amplificó el fragmento de ADN de 565 pb con los iniciadores B64-I : B64-II, mientras que los aislados CAL6, CAL7 y MOCA45 amplificaron el fragmento de ADN de 283 pb con los iniciadores G-1 : G-2. Ninguno de los aislados amplificó fragmentos de ADN con los iniciadores MILL1801 y MILL1802, específicos para identificar leptospirosis saprófitas (Figura 1).

De acuerdo con el análisis filogenético del gen *rrs2*, los aislados fueron identificados como tres diferentes especies de *Leptospira*. Comparando las secuencias con mayor similitud con el programa Megablast (www.megablast.ncbi.org), se encontró que CAL4 tiene 99% de identidad con otras secuencias pertenecientes a *L. kirschneri*; CAL6 tiene 99% de identidad con cepas de *L. interrogans*; CAL7 y MOCA45 tienen 99% de identi-

CUADRO 1

Identificación serológica de los aislados obtenidos en el presente estudio
Serological identification of the obtained isolates

Reference strains			Antibody titers of the rabbit immune sera obtained against the reference strains			
Serogroup	Serovar	Strain	CAL4	CAL6	CAL7	MOCA45
Grippotyphosa	Canalzonae	CZ 188	1:200	-	-	-
Grippotyphosa	Valbuzzi	Duister	1:12,800	-	-	-
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Mandemarkers	1:12,800	-	-	-
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	1:25,600	-	-	1:50
Grippotyphosa	Muelleri	RM 2	1:12,800	-	-	-
Mini	Mini	Sari	-	1:400	1:12,800	-
Mini	Georgia	LT 117	-	1:100	1:3,200	-
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	-	1:25,600	1:3,200	-
Sejroe	Sejroe	M84	-	1:6,400	1:800	-
Sejroe	Wolffi	3705	-	1:400	1:400	1:50
Shermani	Shermani	1342 K	-	-	-	1:800
Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	-	-	-	1:12,800

Genetic classification of such isolates was done by two methods: *rrs2* (16S)²⁸ sequence analysis and by multiple locus sequencing typing (MLST).²⁵

It is well known that Hardjo is a well adapted serovar to cattle, so that infection with no clinical manifestations is possible; however, stress conditions might cause sporadic reproductive disease.²⁹ Serovar Hardjo includes two serologically indistinguishable subtypes that nevertheless, belong to two species:³⁰ *L. borgpetersenii* serovar Hardjo (subtype Hardjobovis) has been considered the most common serovar in cattle around the world. For this reason and despite not having been isolated in México, it is assumed that it is present among cattle in Mexico, since it has been isolated in countries exporting cattle to Mexico (<http://www.siap.gob.mx>).³¹⁻³³ In the present study, the presence of *L. interrogans* serovar Hardjo (subtype Hardjoprajitno), obtained by isolation and molecular characterization (isolate CAL6), has been confirmed. Hardjoprajitno is common in the American continent²⁷ and has been previously isolated in Mexico from a bovine fetus.¹⁵

Studies on the LPS biosynthetic *rfb* locus suggest that subtype Hardjoprajitno evolved from a common ancestor of serovar Copenhageni, which along evolution acquired genes of the *rfb* locus from the subtype

dad con cepas de *L. santarosai*. La relación filogenética entre éstas se muestra en la Figura 2.

La identificación por MLST se realizó mediante la amplificación por PCR, de fragmentos internos de los seis genes, y comparando con el esquema previamente propuesto todos los amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones. CAL6 mostró el tipo de secuencia 254 que lo identifica como *L. interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno. Por el contrario, las cepas CAL4, CAL7 y MOCA45 tienen tipos de secuencias no registradas anteriormente en ninguna parte del mundo (Cuadro 2).

Discusión

La presentación clínica de leptospirosis en bovinos está influida por la serovariedad y la especie infectante. Existen serovariedades adaptadas al bovino, que causan enfermedad esporádicamente, serovariedades no adaptadas que comúnmente causan brotes de presentación aguda, y otras serovariedades de presentación rara en los bovinos en las cuales se desconoce el curso de la enfermedad.²⁷ Por lo tanto, el control de la leptospirosis depende, en parte, de la detección serológica de las serovariedades prevalentes en la región y

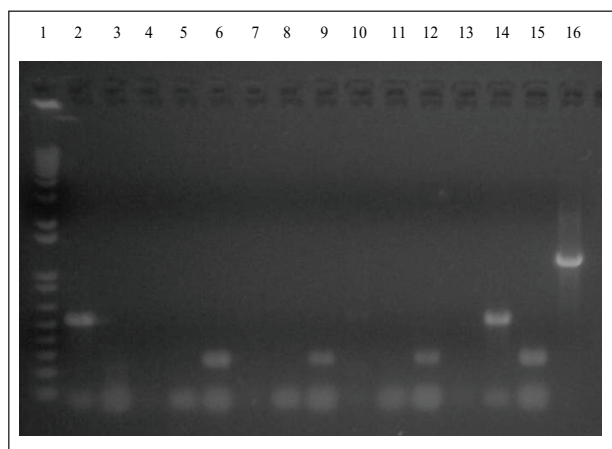


Figura 1. Identificación de los aislados como leptospirosis patógenas por PCR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carriles 2, 3, 4: aislado CAL4 (*L. kirschneri* serovar Grippotyphosa); Carriles 5, 6, 7: aislado CAL6 (*L. interrogans* serovar Hardjo); Carriles 8, 9, 10: aislado CAL7 (*L. santarosai* serovar Mini); Carriles 11, 12, 13: MOCA45; Líneas 14, 15, 16 controles positivos. Carriles 2, 5, 8, 11, 14: reacciones con los iniciadores B64-I : B64-II; Carriles 3, 6, 9, 12, 15: reacciones con los iniciadores G-1 : G-2; Carriles 4, 7, 10, 13, 16: reacciones con los iniciadores MILL1801 y MILL1802 (específicos para serovariedades no patógenas). Carriles 14, 15, 16: Testigos positivos.

Figure 1. Identification of the isolates as pathogenic leptospires by PCR. Lane 1: molecular weight marker; Lanes 2 to 4: isolate CAL4 (*L. kirschneri* serovar Grippotyphosa); Lanes 5 to 7: isolate CAL6 (*L. interrogans* serovar Hardjo); Lanes 8 to 10: isolate CAL7 (*L. santarosai* serovar Mini); Lanes 11 up to 13: isolate MOCA45 (*L. santarosai* serovar Tarassovi). Lanes 2, 5, 8, 11 and 14: PCR with the set of primers B64-I : B64-II (*L. kirschneri* specific); Lanes 3, 6, 9, 12, 15: PCR with the set of primers G1 : G2 (specific for pathogenic species other than *L. kirschneri*); Lanes 4, 7, 10, 13, 16: PCR with the set of primers MILL1801 : MILL1802 (specific for non-pathogenic serovars). Lanes 14, 15, 16: positive controls.

Hardjobovis; this allowed such an ancestor to adapt in some manner to the bovine host, giving origin to sub-type Hardjoprajitno.³⁴

Some other serovars such as Pomona, Grippotyphosa, Bratislava and Icterohaemorrhagiae, are considered as not adapted serovars to cattle, causing acute forms of leptospirosis.²⁹ In Mexico, it has been extensively reported the presence of antibodies against such serovars; nevertheless, there are no reports on their isolation from cattle.^{17,18} It is necessary to identify serovars, adapted or not to cattle, that might be associated with acute disease. In this work, isolate CAL4 was identified as *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa, accordingly to the MAT as well as *rrs2* sequencing and MLST. However, MLST showed a new sequencing type for CAL4: ST259 (Table 2), showing no match in the database and with a phylogenetic relationship with strain Moskva V of serovar Grippotyphosa.

Endemic infections in cattle with atypical *Leptospira* serovars have been shown in different geographical areas; however, the impact in production, animal or public health has not been clearly determined, neither the

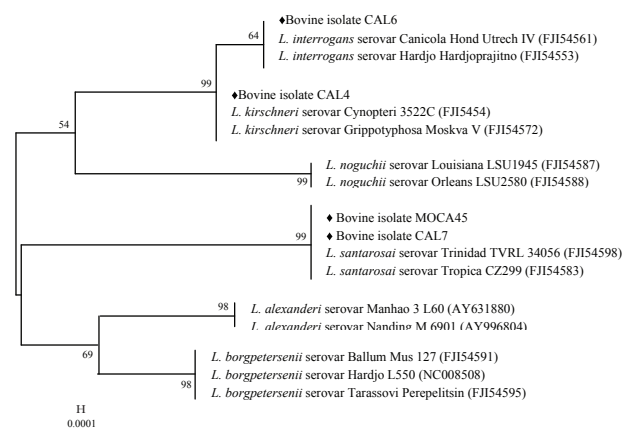


Figura 2. Ribotipificación e identificación de la especie a la que pertenecen los aislados de bovino obtenidos en el presente estudio. El filograma muestra el análisis de las secuencias del gen *rrs2* de los aislados, con las secuencias de cepas de referencia encontradas en el Genbank (con número de acceso).

Figure 2. Species ribotyping and identification of the bovine isolates obtained in the present study. The phylogram shows the sequences of *rrs2* gene from the isolates compared to the sequences of the reference strains found in the Genbank databases (access number).

mejor aún, de su detección mediante el aislamiento. En el presente estudio se realiza la primera descripción de la caracterización molecular de cuatro aislados de *Leptospira* de las especies *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L. santarosai* (dos), aisladas a partir de bovinos en México. La clasificación genética de estos aislados se llevó a cabo mediante dos métodos, por secuenciación del gen *rrs2* (16S ribosomal)²⁸ y por la tipificación mediante la secuenciación de locus múltiples (MLST).²⁵

Es sabido que Hardjo es una serovariedad adaptada al bovino, por lo que es posible que infecte a esta especie animal sin producir la enfermedad, sólo en ciertas condiciones de estrés causa enfermedad reproductiva en forma esporádica.²⁹ La serovariedad Hardjo incluye dos subtipos que se encuentran en dos especies diferentes, pero que son serológicamente indistinguibles:³⁰ *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (subtipo Hardjobovis), ha sido aislada y registrada como la serovariedad más común entre las poblaciones de ganado bovino en todo el mundo. Por esta razón y a pesar de no haber sido aún aislada en México, se intuye que está presente en el país puesto que se ha identificado su presencia en países exportadores de ganado a México (<http://www.siap.gob.mx>).³¹⁻³³ En el presente trabajo, se ha confirmado por medio del aislamiento la presencia de *L. interrogans*, serovariedad Hardjo (subtipo Hardjoprajitno) (aislado CAL6), la cual es común en el continente americano²⁷ y ha sido previamente aislada en México a partir de un feto bovino.¹⁵

Estudios del locus *rflB* para la biosíntesis del LPS sugieren que el subtipo Hardjoprajitno evolucionó a partir de un ancestro de la serovariedad Copenhageni, el

CUADRO 2

Perfil alélico y tipo de secuencia encontrado en los diferentes aislados de *Leptospira*
 Allelic profile and sequencing type found in the *Leptospira* isolates

Serogroup	Species	Serovar	Strain/isolate	Alleles						ST
				<i>adk</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>secY</i>	
Grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	28	119	18	120	66	9	253
Grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	CAL4	28	120	63	122	66	43	259
Sejroe	<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	5	2	2	3	2	113	254
Sejroe	<i>L. interrogans</i>	CAL6	CAL6	5	2	2	3	2	113	254
Pyrogenes	<i>L. santarosai</i>	Prinestown	TRVL 112499	61	45	34	70	44	72	160
Pyrogenes	<i>L. santarosai</i>	Alexi	HS 616	60	45	22	69	19	71	159
Tarassovi	<i>L. santarosai</i>	Bakeri	LT 79	70	61	22	54	18	77	169
Mini	<i>L. santarosai</i>	Mini	CAL7	117	45	34	79	18	116	260
Tarassovi	<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	MOCA45	50	45	22	74	18	117	261

The allele number for each gene was obtained by comparison of the database sequences kindly granted by Ahmed *et al.*²⁵
 The more closely related alleles obtained from the reference strains are also shown.

source of infection; such atypical serovars include Kennewicki in Chile,³⁵ Zanoni in Australia,³⁶ serovars Fugis and Zimbabwe in Zimbabwe,³⁷ and serovar Guaricura in Brazil.³⁸ The present study reports the isolation of serovars not commonly found in cattle, such as isolates CAL7 typified as serovar Mini (ST260) and MOCA45 typified as serovar Tarassovi (ST261), both serovars are classified into the species *Leptospira santarosai*. Infections caused by serovar Mini have been previously reported; however, the isolates were classified into the species *L. interrogans*³⁹ and *L. borgpetersenii*,⁴⁰ but not into *L. santarosai* as the current case in cattle. Conversely, serovar Tarassovi species *L. santarosai*, has been previously isolated in Central and South America but, so far, not in Mexico.

Accordingly to the results of this work, there is no complete relationship between serology in cattle and the obtained isolates; only the animal from which isolate CAL6 was obtained showed a 1:200 antibody titer against the homologous serovar Hardjoprajitno; in contrast, the other three animals from which isolates CAL4, CAL7 and MOCA45 were obtained, showed no antibody titers against any *Leptospira* serovar. Serovar Hardjo was the most frequently detected by MAT in the animals of this study; nevertheless, there were also serovar Tarassovi and Mini isolates showing a low frequency in the MAT. It is generally agreed that sensitivity of the MAT increases when fresh isolates of a specific geographic region are used, in comparison with reference strains.^{16,17,41} For this reason and based on the results of

cual a lo largo del tiempo adquirió genes del locus *rflB* a partir del subtipo Hardjobovis; esto le permitió a dicho ancestro de alguna manera adaptarse al huésped bovino y dar origen así al subtipo Hardjoprajitno.³⁴

Algunas otras serovariedades como Pomona, Grippotyphosa, Bratislava e Icterohaemorrhagiae, son serovariedades no adaptadas al bovino, que causan leptospirosis en su forma aguda.²⁹ En México se ha registrado ampliamente la presencia de anticuerpos contra estas serovariedades, sin embargo, no existen a la fecha datos de su aislamiento a partir de muestras clínicas de bovinos.^{17,18} Por ello, es necesario identificar las serovariedades, adaptadas o no adaptadas al bovino, que pudieran asociarse con enfermedad aguda. En el presente trabajo, de acuerdo con los análisis serológico (AM) y moleculares (secuenciación de *rrs2* y MLST), se identificó al aislado CAL4 como *L. kirschneri* serovariedad Grippotyphosa. La tipificación por MLST de CAL4 mostró un nuevo tipo de secuencia: ST259 (Cuadro 2), no registrado anteriormente en ninguna otra serovariedad de *Leptospira* y que filogenéticamente evolucionó a partir de la serovariedad Grippotyphosa cepa Moskva V.

En diferentes países del mundo se ha registrado la infección en bovinos con serovariedades atípicas, que se presentan en forma endémica en una región, pero no se conoce el impacto de dichas serovariedades en la producción y en la salud de los animales y del hombre, así como la probable fuente de infección, tal es el caso de las serovariedades Kennewicki en Chile,³⁵ Zanoni

this work, it is suggested to include isolates CAL4 (Gripotyphosa), CAL6 (Hardjoprajitno), CAL7 (Mini) and MOCA45 (Tarassovi) in future cattle serological studies and in addition, verify their importance by isolation of *Leptospira* serovars prevalent in the region.

Acknowledgements

This work was partially sponsored by the grants: UNAM/PAPIIT IN222806 and IN221409; SEP-Conacyt 83123 and the Universidad Nacional Autónoma de México MACROPROYECTO No. 7. The scholarship No. 165530 for postgraduate studies of Carlos Alfredo Carmona Gasca awarded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) is greatly appreciated.

The MLST database kindly granted by Dr. Niyaz Ahmed, Hyderabad University, India, and by Dr. Rudy Hartskeerl, Royal Tropical Institute, Neatherlands, is deeply appreciated.

References

- ADLER B, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2010; 140: 287-296.
- AMATREDJO A, CAMPBELL RSF. Bovine leptospirosis. Vet Bull 1975; 43: 875-891.
- ELLIS WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1994; 10: 463-478.
- ELLIS WA, LITTLE TWA. The present state of leptospirosis diagnosis and control. In: ELLIS WA, LITTLE TWA, editors. Current topics in veterinary medicine and animal science. Dordrecht Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1986: 13-21.
- MIKHIN NA, AZINOV SA. Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus. Sovyet Vet 1935; 10: 23-27 (artículo original inexistente, un resumen en: Vet Bull 1937; 7:419).
- JOHNSON D. Epidemiology of Weil's disease. Br Med J 1943; 2: 659.
- JUNGHER E. Bovine leptospirosis. J Am Vet Med Assn 1944; 105: 276-281.
- BRYAN NS, BOLEY LE. Studies on leptospirosis in domestic animals. IV. Survival of *Leptospira Pomona* in bovine semen extender. Mich State Univ Vet 1955; 16: 27-29.
- ELLIS WA, NEILL SD, O'BRIEN JJ, HANNA J, BRYSON DG. The isolation of a strain of *Leptospira* serogroup Icterohaemorrhagiae from an aborted bovine fetus. Br Vet J 1977; 133: 108-109.
- THIERMANN A. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. Am J Vet Res 1982; 43: 780-784.
- MICHNA SW, CAMPBELL RSF. The isolation of *Leptospira* Sejroe from the kidneys of aborting cattle. Vet Rec 1969; 84: 83-86.

en Australia,³⁶ Fugis y Zimbabwe en Zimbabwe,³⁷ y Guaricura en Brasil.³⁸ En el presente trabajo se informa sobre el aislamiento de serovariedades que no son registradas comúnmente en bovinos, como son los casos de los aislados CAL7 de la serovariedad Mini (ST260) y MOCA45 de la serovariedad Tarassovi (ST261), ambos aislados de la especie *L. santarosai*. La serovariedad Mini ha sido registrada en las especies *L. interrogans*³⁹ y *L. borgpetersenii*,⁴⁰ pero Mini de *L. santarosai* no se había encontrado en bovinos; por otro lado, la serovariedad Tarassovi de la misma especie, *L. santarosai*, ha sido aislada previamente de bovinos en Centro y Sudamérica, pero no en México, hasta este informe.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, no existe una relación absoluta entre la serología y el aislamiento; de los cuatro bovinos de los que se obtuvieron los aislados, sólo en el que se aisló CAL6 se observaron títulos de anticuerpos de 1:200 hacia la misma serovariedad, mientras que los otros tres bovinos (CAL4, CAL7, MOCA45) no mostraron títulos de anticuerpos contra ninguna serovariedad. En cuanto a la frecuencia de positivos por serología, la serovariedad Hardjo fue la más frecuentemente detectada en el presente estudio, pero se obtuvieron aislados de las serovariedades Tarassovi y Mini que no mostraron tener importancia por serología utilizando cepas de referencia. Es generalmente conocido que la sensibilidad de la prueba de AM aumenta cuando se incluyen las cepas aisladas (autóctonas) de la región geográfica.¹⁶ Al utilizar los aislados autóctonos aumenta la frecuencia de positivos por AM.^{17,41} Por lo anterior y con base en los resultados mostrados en este estudio, se sugiere incluir los aislados CAL4, CAL6, CAL7 y MOCA45 en posteriores estudios serológicos de bovinos, además de realizar la búsqueda de éstas y otras serovariedades que prevalecen en la región, mediante el aislamiento del agente etiológico, y no sólo con base en los resultados de serología.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos UNAM/PAPIIT IN222806 e IN221409; SEP-CONACyT 83123 y el MACROPROYECTO No. 7 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca No. 165530 para estudios de posgrado de Carlos Alfredo Carmona Gasca.

Los autores agradecen profundamente la ayuda del Dr. Niyaz Ahmed de la Universidad de Hyderabad, India; así como del Dr. Rudy Hartskeerl, del Royal Tropical Institute, Países Bajos, por permitirnos el acceso a la base de datos que hizo posible el análisis de los

12. ROTH EE, GALTON MM. Isolation and identification of *Leptospira* Hardjo from cattle in Louisiana. Am J Vet Res 1960; 21: 422-427.
13. AYANEGUI-ALCERRECA MA, WILSON P, MACKINTOSH CG, COLLINS-EMERSON JM, HEUER C, MIDWINTER AC *et al.* Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. N Z Vet J 2007; 55: 102-108.
14. ZUERNERRL, ELLISWA, BOLINCA, MONTGOMERY JM. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjo-bovis isolates from different geographical locations. J Clin Microbiol 1993; 31: 578-583.
15. SALOMÓN SA, ZERMEÑO G, MOLES CLP. Aislamiento de leptospirosis a partir de animales de granja. Informe de Servicio Social. México DF: Universidad Autónoma Metropolitana, 1988.
16. MYERS M. Manual para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis OPS. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1985. Nota técnica No 30.
17. LUNA AMA, MOLES CLP, GAVALDÓN RD, VÁSQUEZ NC, SALAZAR GF. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Rev Cubana Med Trop 2005; 57: 28-31.
18. CHÁVEZ TR. Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de leptospirosis en animales, de 1989 a 2004 en el departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
19. BOOM R, SOL CJ, SALIMANS MM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495-503.
20. GRAVEKAMP C, VAN DE KEMP H, FRANZEN M, CARRINGTON D, SCHOONE GJ, VAN EYS GJ *et al.* Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol 1993; 139: 1691-1700.
21. MENA BR. Análisis *in silico* de los genes *gspD*_L y *gspE*_L, del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (tesis de maestría). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
22. ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215:403-410.
23. SATOU N, NEI M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987; 4:406-425.
24. TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596-1599.
25. AHMED N, DEVI SM, VALVERDE M DE L, VIJAYACHARI P, MACHANG'U RS, ELLIS WA *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 23: 5-28.
- aislados de *Leptospira*, mediante el esquema MLST por ellos propuesto.
26. XIA X, XIE Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J Hered 2001; 92: 371-373.
27. HANSON LE. Bovine leptospirosis. J Dairy Sci. 1976; 59:1166-70
28. PEROLAT P, MERIEN F, ELLIS WA, BARANTON G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. J Clin Microbiol 1994; 32: 1949-1957.
29. ALONSO-ANDICOBERRY C, GARCÍA-PEÑA FJ, ORTEGA-MORA LM. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest Agr: Prod Sanid Anim 2001; 16: 205-226.
30. RAMADASS P, MARSHALL RB, JARVIS BDW. Species differentiation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo strain Hardjobovis from strain Hardjoprajitno by DNA slot blot hybridisation. J Res Vet Sci 1990; 49: 194-197.
31. ALT DP, ZUERNER RL, BOLIN CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. J Am Vet Med Assoc 2001; 219: 636-639.
32. THIERMANN AB, HANDSAKER JW, FOLEY JW, WHITE FH, KINGSCOTE BF. Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. Am J Vet Res 1986; 47: 61-66.
33. THORNLEY CN, BAKER PM, WEINSTEIN P, MAAS EW. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. Epidemiol Infect 2002; 128:29-36.
34. DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A, BULACH D, KALAMBAHETI T, ADLER B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999; 177: 319-326.
35. ZAMORA J, RIEDEMANN S, MONTECINOS MI, CABEZAS X. Aislamiento en Chile de *Leptospira interrogans* serovares Hardjo y Kennewicki en bovinos aparentemente sanos. Arch Med Vet. 1991; 23: 131-135.
36. SMITH CR, CORNEY BG, MCGOWAN MR, MCCLINTOCK CS, WARD W, KETTERER PJ. Amoxycillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Aust Vet J 1997; 75: 818-821.
37. FERESU SB, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ. DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 1111-1117.
38. VASCONCELLOS SA, OLIVEIRA JCF, MORAIS ZM, BARUSELLI PS, AMARAL R, PINHEIRO SR *et al.* Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, Sao Paulo, Brazil. Braz J Microbiol 2001; 32: 298-300.
39. TORTEN M, BIRNBAUM S, KLINGBERG MA, SHENBERG E. Epidemiologic investigation of an

- outbreak of leptospirosis in the Upper Galilee, Israel. Am J Epidemiol 1970; 91:52-8
40. VEDHAGIRI K, NATARAJASEENIVASAN K, PRABHAKARAN SG, SELVIN J, NARAYANAN R, SHOUCHE YS *et al.* Characterization of *Leptospira borgpetersenii* isolates from field rats (*Rattus norvegicus*) by 16S rRNA and *lipL32* gene sequencing. Braz J Microbiol 2010; 41: 150-157.
 41. MOLES CLP, CISNEROS PMA, GAVALDÓN RD, ROJAS SN, TORRES BJI. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev Cubana Med Trop 2002; 54: 24-27.