

# Estudio de variabilidad genética en aislamientos de *Leptospira* spp., en sistemas bovinos de carne y doble propósito

## Genetic variability study of field *Leptospira* spp. isolates in beef and double purpose bovine production systems

### Estudo de variabilidade genética em isolamentos de *Leptospira* spp., em sistemas bovinos de carne e duplo propósito

Elizabeth Regina Cassalet-Bustillo,<sup>1</sup> Rocío Esperanza Patiño-Burbano,<sup>2</sup>  
José Luis Rodríguez-Bautista,<sup>3</sup> José Luis Parra-Arango<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MSc, Universidad Nacional de Colombia. Investigadora máster, Corpoica. Villavicencio, Colombia. ecassalett@corpoica.org.co.

<sup>2</sup> MSc, Pontificia Universidad Javeriana. Investigador máster, Corpoica. Mosquera, Colombia. rpatino@corpoica.org.co

<sup>3</sup> MSc, Washington State University. Investigador máster, Corpoica. Mosquera, Colombia. jlrodriguez@corpoica.org.co

<sup>4</sup> MSc, Universidad Nacional de Colombia. Investigador máster, Corpoica, Villavicencio, Colombia, jparra@corpoica.org.co

Fecha de entrega: 28/07/2015

Fecha de aceptación: 20/01/2016

Para citar este artículo: Cassalet-Bustillo ER, Patiño-Burbano RE, Rodríguez-Bautista JL, Parra-Arango JL. Estudio de variabilidad genética en aislamientos de *Leptospira* spp., en sistemas bovinos de carne y doble propósito. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(2):229-236

## Resumen

A partir de riñón y orina de bovinos, se aislaron en campo serovares de *Leptospira* spp., en los departamentos de Cundinamarca y Meta, Colombia. Los aislamientos fueron clasificados mediante análisis filogenético y ribotipificación, utilizando como marcador el gen 16S ADN<sub>r</sub>. El análisis filogenético permitió clasificar los aislamientos en dos de las tres genomoespecies reconocidas: patógeno e intermedio, siendo este último de gran importancia, dado que no se conoce su patrón de comportamiento inmunológico ante un huésped, lo que podría generar respuestas variables. En la ribotipificación se obtuvieron ribopatrones de cuatro aislamientos de leptospira y cinco cepas de referencia con mayor identidad y su análisis mostró la presencia de dos perfiles

predominantes dentro de los cuatro aislamientos. Un perfil coincidió con la cepa de referencia intermedia y otro perfil fue similar a la cepa de referencia patógena serovares *Copenhageni* y *Lai*. El análisis filogenético del aislamiento, fue agrupado dentro de leptospiras tipo intermedio y su patogenicidad se encuentra todavía en estudio. Los análisis filogenéticos de especies de leptospiras basados en secuencias comparativas del gen 16S ADN<sub>r</sub>, permiten confirmar e identificar tres grupos según su estatus de patogenicidad (patógeno, saprofítico e intermedio), donde el propósito taxonómico de los marcadores genera resultados consistentes en obtener secuencias del gen 16S ADN<sub>r</sub> agrupados en un árbol filogenético.

**Palabras clave:** gen, ADN Ribosomal, leptospira, ganado bovino, filogenia

## Abstract

*Leptospira* spp. serovars were isolated from bovine kidney and urine in the Cundinamarca and Meta departments of Colombia. The isolates were classified by both, phylogenetic analysis and ribotyping, using 16SDNAr as a marker gene. The Phylogenetic analysis allowed the classification of the isolates into two of the three genomospecies recognized: pathogenic and intermediate. The latter is of great importance because its immunological behavior in a host is unknown and this could generate variable answers. Ribotyping yielded “ribopatterns” of four *Leptospira* isolates and five reference strains with major identity; the analysis showed the presence of two predominant profiles in the four isolates.

One profile was in line with the intermediate reference strain and the other profile was similar to the pathogenic reference strain, Copenhageni and Lai serovars. The isolate by phylogenetic analysis was placed within the intermediate type *Leptospiras* and its pathogenicity is still under study. The phylogenetic analysis of *Leptospira* species based on comparative sequences of 16SDNAr gene confirmed the possibility of identifying three groups according to their pathogenic status (pathogenic, intermediate and saprophytic), where the taxonomic purpose of the markers, showed consistent results in obtaining sequences of the 16SDNAr gene, grouped in a phylogenetic tree.

**Keywords:** Gen, Ribosomal ADN, *Leptospira*, Cattle, Phylogeny

## Resumo

A partir de rim e urina de bovinos, se isolaram em campo serovares de *Leptospira* spp., nos departamentos de Cundinamarca e Meta, Colômbia. Os isolamentos foram classificados mediante análise filogenética e ribotipificação, utilizando como marcador o gene 16S ADNr. A análise filogenética permitiu classificar os isolamentos em dois das três genomo-espécies reconhecidas: patógeno e intermédio, sendo este último de grande importância, dado que não se conhece o seu padrão de comportamento imunológico perante um hospede, o que poderia gerar respostas variáveis. Na ribotipificação obtiveram-se ribopatrões de quatro isolamentos de leptospira e cinco cepas de referência com maior identidade e a sua análise mostrou a presença de dois perfis predominantes

dentro dos quatro isolamentos. Um perfil coincidiu com a cepa de referência intermédia e outro perfil foi similar à cepa de referência patogena serovares *Copenhageni* e *Lai*. A análise filogenética do isolamento, foi agrupada dentro de leptospiras tipo intermédio e a sua patogenicidade se encontra ainda em estudo. As análises filogenéticas de espécies de leptospiras baseados em sequências comparativas do gene 16S ADNr, permitem confirmar e identificar três grupos segundo o seu status de patogenicidade (patógeno, saprofítico e intermédio), onde o propósito taxonômico dos marcadores gera resultados consistentes em obter sequências do gene 16S ADNr agrupados em uma árvore filogenética.

**Palavras chave:** gene, ADN Ribosomal, leptospira, gado bovino, filogenia

## Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica con altas tasas de morbimortalidad en humanos y animales causada por una espiroqueta que se encuentra en el medioambiente y una amplia gama de animales (Díaz et al. 2011; Organización Mundial de Sanidad Animal 2008). La bacteria genera trastornos reproductivos en los bovinos y porcinos y está clasificada en subgrupos y serovares determinados por sus funciones antigénicas (Zuluaga 2009). El género *Leptospira* está dividido en especies patógenas y saprófitas con 20 genomoespecies, basado en el estudio del gen 16S; a su vez, se han dividido en tres grupos filogenéticos: patógenas, intermedias y saprófitas, y cada uno de ellos está conformado por diferentes serovares, considerados de importancia para monitoreo diagnóstico y epidemiológico (Fenner et al. 2010; Cerqueira y Picardeau 2009). En estudios epidemiológicos realizados en el país (Díaz et al. 2011) se examinaron serológicamente 2.140 sueros bovinos del Eje Cafetero y se encontró que 681 muestras (32%) resultaron positivas al serovar *L. hardjo*; 390 muestras (18,2%), al serovar *L. icterohaemorrhagiae*; 207 muestras (9,6%) al serovar *L. pomona* y 182 (8,5%) al serovar *L. canicola*.

Evidencias serológicas y aislamientos realizados en el país, indican que *L. hardjo* tiene importancia epidemiológica en los bovinos de los Llanos Orientales con prevalencias del 63,5%, en hatos del Valle del Cauca, con el 80,9% y en la costa Caribe, con el 89,1%. Así mismo, estudios de las regiones Caribe, piedemonte llanero y Andina mostraron prevalencias de leptospirosis serovar *L. hardjo* del 32,8%, 24,8% y 14,4%, respectivamente, con un promedio para el país del 21,7%. En el país, se han realizado estudios de ribotipificación y análisis filogenético de especies de *Leptospira* en diferentes especies de animales, así: en bovinos, Torres et al. (2013), obtuvieron ribopatrones de 19 aislamientos de *Leptospira* y 10 cepas de referencia (serovares Pomona, Tarassovi, Wolffi, Pyrogenes, Hardjo, Grippotyphosa, Canicola, Ballum Icteroahemorrhagiae y Patoc). Romero-Vivas et al. (2013) obtuvieron de aislamientos en

cerdos relacionamiento con *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona; un aislamiento de rata fue indistinguible de *Leptospira interrogans* serovariedades Icterohaemorrhagiae o Copenhageni, mientras que aislamientos de perro y agua no se relacionaron con alguna de las 200 cepas de referencia; las más cercanas son *L. noguchii* serovares Nicaragua y Orleans.

El objetivo de este trabajo fue clasificar aislamientos de campo de *Leptospira* a través del análisis filogenético y de los ribopatrones basados en el polimorfismo generado por los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), utilizando como marcador molecular el gen 16S ADN<sub>r</sub>, con el fin de poder identificar especie, grupo de patogenicidad, serovar y variantes genéticas dentro de estos aislamientos

## Materiales y métodos

Las ecorregiones escogidas para desarrollar el trabajo fueron valles interandinos, costa Caribe y piedemonte llanero. Se tomaron 140 muestras de riñón y 20 de orina de bovinos, directamente de vejiga, en cinco mataderos ubicados en Zipaquirá (Cundinamarca), Ibagué-Espinal (Tolima), Guamal (Meta) y Ciénaga de Oro (Córdoba). Así mismo, se obtuvieron 367 muestras de orina por micción espontánea en 11 hatos bovinos ubicados en el altiplano cundiboyacense (3), Tolima (2), Córdoba (2), Meta (2) y Casanare (2). Para el trabajo de toma de muestras, se utilizaron dos formatos de toma de información en campo y, para los aislamientos, se implementaron los protocolos de aislamiento de leptospira a partir de riñón y de orina que hacen parte del Banco de Germoplasma de Microorganismos, Virus y Bacterias de Corpoica.

En la planta de sacrificio, se retiró el riñón completo y se transportó sin refrigeración a un sitio de menor contaminación; el área de extracción de la muestra se esterilizó con una espátula caliente y ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Se sembró en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

(EMJH) y después de 48 horas de incubación a 30 °C, se tomaron 3 ml del cultivo inicial que fue filtrado a través de un filtro milipore (0,22  $\mu\text{m}$ ) a un medio semisólido con 0,1% de agar. La incubación a 30 °C se mantuvo hasta por 90 días, tiempo en el cual se descartó como negativo o se determinó como positivo, al observar la aparición de un anillo en la porción media del tubo, indicativo de crecimiento de *Leptospira* spp.

El aislamiento de *Leptospira* spp. a partir de orina recolectada de micción espontánea o directamente de vejiga de animales sacrificados, se realizó pasando 3 ml de la orina a través de un filtro milipore (0,22  $\mu\text{m}$ ) y sembrado en medio semisólido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con 0,1% de agar a 30 °C. Se revisaron los cultivos cada 8 días para observar el crecimiento y verificar que no existiera contaminación. Si se contaminaban, el cultivo era filtrado con membrana de 0,22mm y llevado nuevamente a incubación a 30 °C, hasta observar o no el crecimiento de leptospira por un lapso no mayor a 90 días.

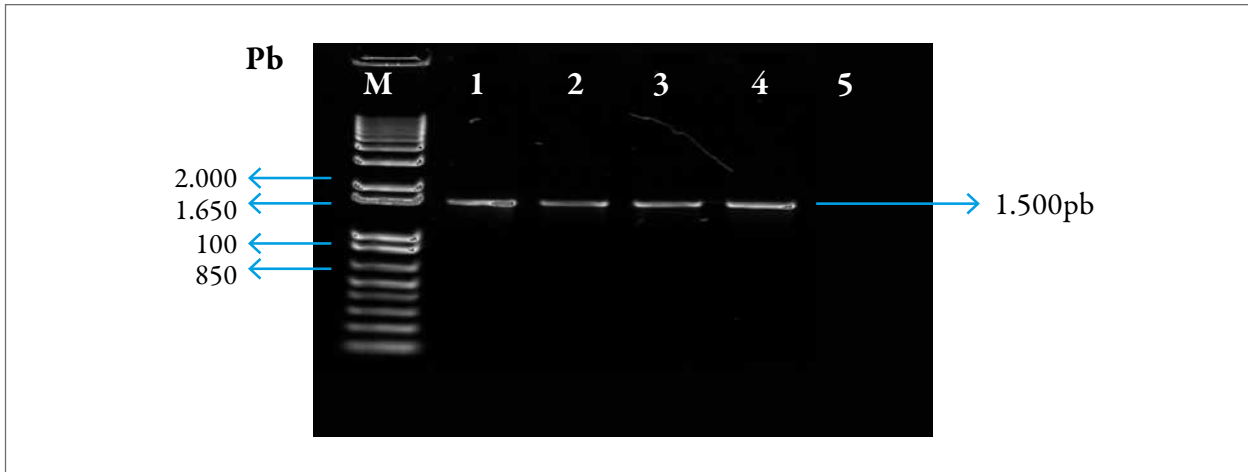
Para el análisis filogenético, a los aislamientos se les realizó extracción de ADN por el método de fenol cloroformo, de acuerdo al protocolo Extracción de ADN para bacterias del género *Leptospira* Código IN-R-104. La amplificación de la región 16S del ADNr fue realizada por PCR (protocolo código IN-R-107), utilizando iniciadores universales externos (Morey et al. 2006; Janda y Abbott 2007). Los productos de PCR fueron clonados, utilizando un kit comercial TOPO TA 4 Cloning® Kit (Invitrogen) y el ADN plasmídico fue secuenciado. Las secuencias del 16S ADNr fueron alineadas y comparadas con las bases de datos del GenBank, usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para la construcción de los árboles filogenéticos. Para la ribotipificación, se utilizó la enzima de restricción EcoRV; este polimorfismo fue evidenciado por Southern Blot, utilizando sondas marcadas, homólogas a secuencias de ADN del gen 16S ADNr y el proceso de detección fue realizado por quimioluminiscencia.

El análisis de la secuencia del gen 16S ADNr de los aislamientos de leptospira permitió la identificación de especie y clasificarlos dentro de los tres grupos de patogenicidad previamente establecidos: patógeno, saprofita e intermedio. Este análisis se realizó con los siguientes criterios:

- Porcentaje de cubrimiento. Por medio del cual se determina el porcentaje de homología entre la secuencia problema y las reportadas en las bases de datos.
- Porcentaje de identidad. Por medio del cual se determina el grado de identidad que existe entre la secuencia problema y las reportadas en las bases de datos. Los porcentajes por debajo de 95 % no fueron tenidos en cuenta, puesto que cepas con menor porcentaje de identidad en las secuencias de la región del gen 16S ADNr es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie.
- Valor E (E-Value). Por medio del cual se determina la probabilidad de que el resultado obtenido sea el más acertado.

## Resultados y discusión

Una vez realizado el seguimiento bacteriológico, se determinaron 69 aislamientos como sospechosos, los cuales fueron sometidos a pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando el gen 16S del ADNr, para analizar si estas espiroquetas están agrupadas en un ancestro común de protospirocheta, como lo determinan Paster et al. (1991). Se obtuvieron cuatro productos de amplificación de la región del 16S del ADNr (figura 1), que mostraron un fragmento cuyo tamaño fue aproximadamente de 1.500 pb. Así se determinó la presencia de *Leptospira* spp. en esos aislamientos, lo que confirma la sensibilidad y especificidad de la prueba, de esta manera se concordó con lo obtenido anteriormente por varios investigadores que amplificaron el gen 16S (Grimont y Grimont 1986; Paster et al. 1991; Cerqueira y Picardeau 2009; Torres et al. 2013; Romero-Vivas et al. 2013).



**Figura 1.** M: Marcador de ADN 1 kb Plus. 1. Lep 091; 2. Lep 092; 3. Lep 093; 4. Lep 094; 5. Control negativo de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Los aislamientos que amplificaron a leptospira pertenecían los departamentos del Meta y Cundinamarca, según se describe en la tabla 1. Se confirmó que en Colombia, al igual que en otros países como Brasil, India y Nicaragua, existe circulación de cepas de *Leptospira* spp. en el

sistema de producción bovino (Moreno y Agudelo-Flórez 2010). Estos aislamientos de leptospira en las dos zonas del país, son determinantes para estudios de respuesta inmunológica, dada la característica de patogenicidad de las especies encontradas.

**Tabla 1.** Aislamientos de *Leptospira* spp. que amplificaron por prueba de PCR región 16S ADNr

Aislamiento	Departamento-municipio	Identificación	Sitio de muestreo
Lep 091	Meta-Guamal	Riñón N° 15	Matadero
Lep 092	Cundinamarca-Lenguazaque	5610	Finca La Vuelta al Río
Lep 093	Cundinamarca-Zipacquirá	Riñón N° 4	Matadero
Lep 094	Meta-Castilla la Nueva	9022	Finca San Francisco

Fuente: Elaboración propia

El análisis de secuencia de la región 16S ADNr de los cuatro aislamientos de leptospira permitió su clasificación en dos grupos de patogenicidad (tabla 2). Según los resultados obtenidos del análisis filogenético de este gen, tres aislamientos fueron agrupados dentro de las especies patógenas y uno se relaciona filogenéticamente dentro del grupo de Leptospiras que presentan una patogenicidad de tipo intermedia; es importante destacar que los

árboles filogenéticos de estos aislamientos muestran mayor cercanía con las especies patógenas que con las saprófitas (Postic et al. 2000).

En la ribotificación se obtuvieron ribopatronos de cuatro aislamientos de leptospira y cinco cepas de referencia con mayor identidad (serovares Vughia, Hurstbridge, Copenhageni y Lai); el análisis de estos ribopatronos mostró la presencia de dos perfiles

predominantes dentro de los cuatro aislamientos (tabla 2). Un perfil coincidió con la cepa de referencia intermedio y otro perfil fue similar a la cepa de referencia patógena serovares Copenhageni y Lai. La patogenicidad del aislamiento que, por análisis filogenético fue agrupado dentro de las leptospiras de tipo intermedia, se encuentra todavía en estudio (Cerqueira y Picardeau 2009, Torres

et al. 2013; Moreno y Agudelo-Flórez 2010). El aislamiento de cepas de carácter intermedio cobra gran importancia, dado que no se sabe el patrón de comportamiento inmunológico ante un huésped, lo que podría generar respuestas variables ante la presencia de este tipo de especies, lo que hace más complejos los estudios epidemiológicos.

**Tabla 2.** Secuencias de los diferentes aislamientos de campo de *Leptospira* spp. en Colombia

Aislamiento	Especies con las de mayor identidad	Subgrupo de patogenicidad
Lep 091 (Col-B-70)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leptospira noguchii</i> strain CZ 214 K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</li> <li>• <i>Leptospira weilii</i> serovar Vughia strain LT 89-68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</li> </ul>	Patógeno
Lep 092 (Col-B-71)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge strain BKID 6 serovar Hurstbridge 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</li> <li>• <i>Leptospira broomii</i> partial 16S rRNA gene, SSI 5402-98</li> </ul>	Intermedio
Lep 093 (Col-B-72)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Copenhageni</i> str. Fiocruz L1-130. Strain Fiocruz L1-30 16S ribosomal</li> <li>• <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Lai</i> str. 56601 strain 56601 ribosomal RNA gene, complete sequence</li> </ul>	Patógeno
Lep 094 (Col-B-73)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Copenhageni</i> str. Fiocruz L1-130. Strain Fiocruz L1-30 16S ribosomal</li> <li>• <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Lai</i> str. 56601 strain 56601 ribosomal RNA gene, complete sequence</li> </ul>	Patógeno

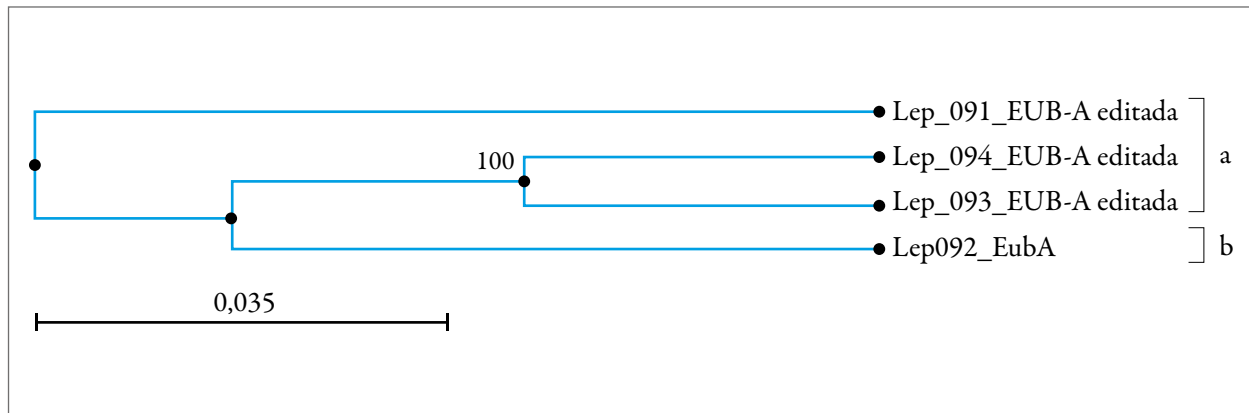
Fuente: Elaboración propia

Con los resultados obtenidos del análisis de las secuencias del gen 16S ADNr se procedió a construir los árboles filogenéticos que reflejan de forma esquemática (figura 1) el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas utilizando el algoritmo Blast y el método de clústers UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). El método evidenció mayor parentesco

entre los aislamientos Lep093 y Lep094, estando, a su vez, estos dos más alejados de los Lep091 y Lep092, con un porcentaje de cubrimiento en todos los casos del 99 y 100% (figura 2). El resultado del árbol filogenético de estos aislamientos mostró efectivamente lo que se esperaba: mayor acercamiento de los Lep093 y Lep094, dado que estos tenían mayor afinidad por las especies *Leptospira*

*interrogans* serovar Copenhageni y *Leptospira interrogans* serovar Lai, como también mayor distanciamiento del Lep091 que tiene mayor afinidad con la *Leptospira noguchii* y *Leptospira weilii* serovar Vughia. El aislamiento del grupo

intermedio se encuentra más cercano a los Lep093 y Lep094 (*L. interrogans*), lo que permite inferir que posiblemente su comportamiento ante un huésped podría ser más hacia patógeno que saprofítico.



**Figura 2.** Análisis filogenético. a. Aislamiento de leptospira relacionado filogenéticamente dentro del grupo patógeno; b. Aislamiento de leptospira relacionado filogenéticamente dentro del grupo intermedio.

Fuente: Elaboración propia

Los análisis filogenéticos de especies de leptospiras, basados en secuencias comparativas del gen 16S ADN<sub>r</sub>, permiten confirmar lo asegurado previamente (Paster et al. 1991; Schmid et al. 1986; Matthias et al. 2008), sobre la posibilidad de identificar tres grupos basados en el estatus de patogenicidad (patógeno, saprofítico e intermedio), donde el propósito taxonómico de los marcadores genera resultados consistentes en obtener secuencias del gen 16S ADN<sub>r</sub>, agrupados en un árbol filogenético. Así mismo, la agrupación de las bacterias por ribotipificación es frecuentemente usada para propósitos taxonómicos y caracterización de subgrupos de microorganismos de diferentes especies de leptospira (Grimont y Grimont 1986). Lo importante del uso de estas herramientas moleculares es poder clasificar adecuadamente los microorganismos de interés en salud pública con el fin de tomar medidas profilácticas y curativas adecuadas.

## Conclusiones

El uso de la ribotipificación de las especies de *Leptospira* spp. circulantes en el sistema de producción

bovino es una herramienta primordial y fundamental para las entidades de control sanitario y para los profesionales clínicos, que manejan el diagnóstico de la *Leptospira* spp. como causal de problemas reproductivos. El análisis filogenético del gen 16S permitió clasificar los aislamientos dentro de las especies reconocidas hasta el momento y definir su estatus de patogenicidad.

La ribotipificación permitió confirmar estos resultados y discriminar variantes genéticas; sin embargo, no se observó heterogeneidad dentro de los aislamientos analizados. Los métodos de análisis filogenético y ribotipificación son complementarios para la identificación de aislamientos patógenos de leptospira provenientes de diferentes fuentes.

## Descargos de responsabilidad

El presente trabajo es producto de la investigación realizada por los autores, quienes no manifiestan conflictos de interés con respecto a este artículo.

## Referencias

- Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 9(5):760-768.
- Díaz OL, Orjuela JE, Ortiz J, Patiño A, Linares C, González PM. 2011. Colombia, sanidad animal 2009. Bogotá, Colombia: ICA.
- Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, Dalley CG, Woodward MJ. 2010. Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. *Res Vet Sci.* 89(1):48-57.
- Grimont F, Grimont PA. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 137(2):165-175.
- Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45(9):2761-2764.
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, et al. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2(4):e213.
- Moreno N, Agudelo-Flórez P. 2010. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 27(4):548-556.
- Morey RE, Galloway RL, Bragg AL, Steigerwalt AG, Levett PN. 2006. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 44(10):3510-3516.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Paris, Francia: OIE. Capítulo 2.1.9. Leptospirosis; pp. 251-260.
- Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablén L, Mandelco L, Woese CR. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol.* 173(19):6101-6109.
- Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P, Baranton G. 2000. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol.* 151(5):333-341.
- Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Mattar S, Cuello M, Levett P, Falconar AK. 2013. Serovar characterization at the molecular level of *Leptospira* spp. isolates from animals and water in Colombia. *Biomédica.* 33(Supl. 1):179-184.
- Schmid GP, Steere AC, Kornblatt AN, Kaufmann AF, Moss CW, Johnson RC, Hovind-Hougen K, Brenner DJ. 1986. Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadai*" serovar lyme) isolated from human skin. *J Clin Microbiol.* 24(3):484-486.
- Torres L, Rodríguez JL, Jiménez SC, Patiño RE. 2013. Genotipificación de aislamientos Colombianos de *Leptospira*. Resumen presentado en: II Congreso Brasileiro de Recursos Genéticos. Belem, Brasil.
- Zuluaga AG. 2009. Factores de riesgo asociados a leptospirosis en hatos bovinos de Pereira, 2002-2005. *Investig Andina.* 11(19):109-117.