

# Identificación Molecular de *Leptospira* spp. patógenas en explotaciones bufalinas de Venezuela

Rosaura Pérez Gil<sup>1,2\*</sup>, MV, MSc; Gabriela Portillo<sup>3</sup>, Biol, MSc; José Aranguren<sup>3,4</sup>, MV, PHD; Robert Valeris<sup>5</sup>, MV, Msc.

1 Gerente Centro Diagnóstico Veterinario Rosaura Pérez Gil, Araure Venezuela.

2 Gerente P&P Suministros Médicos Veterinarios CA, Araure Venezuela.

3 Profesor Cátedra Genética Animal La Universidad del Zulia, Maracaibo Venezuela.

4 Director del Laboratorio de Genética Molecular, La Universidad del Zulia, Maracaibo Venezuela.

5 Profesor Cátedra Infectología Veterinaria La Universidad del Zulia, Maracaibo Venezuela

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que afecta a una gran cantidad de especies y produce grandes pérdidas económicas debido a muertes de crías nacidas débiles, abortos o infertilidad, principalmente en los animales domésticos. Es producida por gérmenes patógenos en forma de espiroquetas pertenecientes al género *Leptospira*. Representa una enfermedad emergente, la cual ha sido evaluada mediante estudios serológicos, pero que no son lo suficiente acertados. De allí que el propósito de esta investigación sea el primer reporte de diagnóstico molecular de leptospirosis en búfalos en Venezuela, a partir de animales naturalmente infectados rebaños comerciales. El experimento consistió en la evaluación de setenta (70) búfalas con antecedentes de problemas reproductivos (abortos, baja fertilidad, crías con pesos bajos, mortalidad y hemoglobinuria), a las cuales se les toma muestra de orina para cultivo y tejido de úteros, oviducto y riñón de 9 hembras beneficiadas. Se realizó extracción de ADN y se amplificó para leptospirosis de las cuales el 100% de los 9 animales beneficiados fueron positivos en algunos de los tejidos evaluados; mientras que de las muestras de orina se obtuvo 36,9 y 25 % para G1-G2 y 7,8% y 12,5% para Internal 1-Internal 2; en los cultivos de muestras de orina positividad en 13% y 15,6% en ambos marcadores y ratificada por PCR, para el establecimiento A y B, respectivamente. Se evidencia que la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil, con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de leptospirosis en búfalos.

Palabras Clave: PCR, *Leptospira*, Búfalo, Diagnóstico, Aborto

Key Words: PCR, *Leptospire*, Buffaloes, Diagnostique, Abort

## Introducción

El búfalo de agua es una de las especies mejor adaptada a los sistemas de producción en áreas tropicales y en Venezuela, representa una de las ganaderías con más repunte en las últimas décadas. No obstante, por su preferencia en ambientes húmedos, es más susceptible a la leptospirosis. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que puede ser fatal en humanos y causar serios problemas reproductivos en animales. Existe evidencia serológica en establecimientos de búfalos de varios países del mundo como Sri Lanka, Priyantha et al. (2010) Argentina, Konrad et al. (2013) Tailandia Suwancharoen et al. (2013) Colombia Motta et al. (2014) Egipto Horton K et al. (2014) Venezuela, González y Rivera (2015) Filipinas, Villanueva et al. (2016). Varios autores han cultivado la bacteria de muestras de orina de vacas y tejido identificándola mediante técnicas moleculares, Cheema et al. (2007); Quaresma M et al. (2008), Chideroli et al. (2016)

Este estudio se justifica porque contribuye a entender las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en infecciones naturales en búfalos (*Bubalus bubalis*) en Venezuela.

El objetivo de éste trabajo fue identificar molecularmente la presencia de *Leptospira* spp. patógenas en búfalas (*Bubabulus bubalis*) en dos establecimientos de Venezuela, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

## Materiales y Métodos

Tabla No 1  
Establecimientos y animales del estudio

| Establecimiento    | A    | B          |
|--------------------|------|------------|
| Ubicación (Estado) | Lara | Portuguesa |
| Año de estudio     | 2013 | 2016       |
| Altitud (msnm)     | 1200 | 90         |
| Cantidad Búfalas   | 50   | 68         |
| Cantidad Buvillas  | 0    | 22         |

Tabla No 2  
Síntomas en búfalas y buvillas, establecimientos A y B

| Establecimiento                                   | A         |          | B         |          |
|---|-----------|----------|-----------|----------|
|   | Presencia | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| Aborto  | 1         | 49       | 4         | 64       |
| Hemoglobinuria                                    | 14        | 36       | 0         | 68       |
| Mucosa Vaginal Ictérica                           | 20        | 30       | 12        | 56       |
| Mucosa Vaginal Congestiva                         | 3         | 47       | 0         | 68       |
| Bucerros nacidos temporada 2014-2015              | 44        | 6        | 38        | 30       |
| Bucerros bajo peso (menos 28 Kg)                  | 0         | 50       | 30        | 8        |
| Mortalidad Bucerros recién nacidos                | 1         | 43       | 6         | 32       |
| Buvilla vacías                                    | 0         | 0        | 9         | 13       |
| Buvillas fibrosis uterina (palpación transrectal) | 0         | 0        | 4         | 5        |
| Buvillas salpingitis (palpación transrectal)      | 0         | 0        | 3         | 6        |
| Buvillas quiste folicular (palpación transrectal) | 0         | 0        | 1         | 8        |
| Buvillas líquido uterino (palpación transrectal)  | 0         | 0        | 1         | 8        |

Un total de 70 muestras de orina del (38 y 32 establecimiento A y B respectivamente) Se beneficiaron las 9 buvillas no gestantes del establecimiento B, colectándose úteros con ovarios y un riñón en matadero. Se hizo disección de los úteros se tomó 1 cm<sup>2</sup> de tejido del cuerno uterino en el tercio medio, 1 cm de oviducto en el tercio medio; se hizo disección del riñón se tomó 1 cm<sup>3</sup> de tejido de la región cortical. Se tomó dos muestras de tejido, uno se colocó en frasco con tapa con formol al 10% para estudio histopatológico, el otro tejido se colocó en capsula de Petri para inocularlo en medio de cultivo EMJH más 10 % BSA durante 2 horas, cuando se retiró el tejido del tubo. Un inóculo de 250 µl de orina se colocó en tubos con 5 ml de medio de cultivo EMJH, más 10 % BSA. Alícuotas de 1,5 ml fueron almacenadas en viales de 1,5 ml y congeladas - 21°C para su posterior identificación molecular.

Para validar los marcadores se utilizó bacterinas comercial que contienen leptospiras patógenas: Lepto Shield<sup>®</sup> y Vira Shield<sup>®</sup> y la cepa de provenientes del cepario del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel: *Leptospira interrogans hadjoprattjino*.

La extracción del ADN se hizo con el kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, luego se almacenaron los ADN a -21 °C.

Se ejecutó una PCR para identificar *Leptospira* spp utilizando dos pares de primers para los marcadores, G1 (5'-CTGAATCGCTGT ATAAAAGT-3') y G2 (5'-GGAAAACAAATGGTTCGGAAG-3'), descrito por Gravekamp y col. (1993) e Internal 1 (5'-GAC GGT TTA GTC GAT GGA AAC-3'), Internal 2 (5'-GGG AAA AGC AGA CCA ACA GA-3') descrito por Haake et al. (2000). La Amplificación con G1-G2 se hizo en volumen 25 µl con 40-50 ng de ADN genómico, 2,5 µl de Buffer 10X, 0,04 µM de cada primer G1-G2, 200 µM de dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U ADN polimerasa Taq y 17,65 µl de agua ultra pura. La desnaturalización prolongada a 94 °C por 3 minutos, el programa

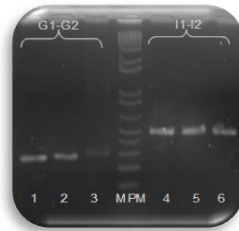
PCR de 40 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 90 segundos, la hibridación a 51 °C por 60 segundos y una extensión a 72 °C por 60 segundos; extensión final a 72 °C por 3 minutos.

La Amplificación con Internal 1 e Internal 2 se hizo en volumen 25 µl con 40-50 ng de ADN genómico, 2,5 µl de Buffer 10X, 0,04 µM de cada primer I1 e I2, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U ADN polimerasa Taq y 16,25 µl de agua ultra pura. La desnaturalización prolongada a 94 °C por 3 minutos, el programa PCR de 40 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, la hibridación a 51 °C por 60 segundos y una extensión a 72 °C por 60 segundos; la extensión final a 72 °C por 3 minutos.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0,7%, las muestras que amplificaron los marcadores G1-G2 generaron amplicones con un patrón de banda de 285 pb y las que amplificaron los marcadores Internal 1 e Internal 2, generaron amplicones con un patrón de banda de 497 pb.

### Resultados Y Discusión

Las 2 bacterinas comerciales Lepto Shield<sup>®</sup> y Vira Shield<sup>®</sup> y la cepa de referencia amplificaron los marcadores G1-G2 generando patrón de banda de aproximadamente 285 pb y 497 pb para Internal 1-Internal 2, marcador de peso molecular Promega 50 pb (ver figura No 1).



**Figura No 1.** Gel de agarosa al 2% de productos de PCR. Bacterinas comerciales pentavalentes de *Leptospira*. 1 y 4 Lepto Shield<sup>®</sup>, 2 y 5 Vira Shield<sup>®</sup>. 3 y 6 *L. interrogans hardjoprattijno*. Marcadores G1-G2: se observa una banda de alrededor de 285 pb. Internal 1-Internal 2: se observa una banda de alrededor de 497 pb.

La PCR identificó *Leptospira* spp muestras de orina de búfalas (*Bubalus bubalis*) con los marcadores G1-G2 en 36,9% y 25% del establecimiento A y B respectivamente; con los marcadores Internal 1 e Internal 2, 7,8% y 12,5% resultaron positivas a *Leptospira* spp patógenas del establecimiento A y B respectivamente (Ver Tabla No 3 y figura No 2). En cultivos de muestras de orina la PCR identificó *Leptospira* spp en 13% y 15,6% con los marcadores G1-G2 de establecimiento A y B respectivamente, Con los marcadores Internal 1 e Internal 2, resultaron 13% y 15,6% positivas a *Leptospira* spp patógenas de establecimiento A y B respectivamente. (Ver Tabla No 4 y Figura No 3). Éstos resultados contrastan con Jafari et al. (2001) que obtuvieron 17% de muestras de orina positiva de vacas naturalmente infectadas a los marcadores G1-G2; Quaresma et al (2008) le amplificó el 86,6% de muestras de orina usando primers de la secuencia de LipL32, de igual manera Chideroli et al. (2016) evaluaron 15 muestras de orina en vacas naturalmente infectadas y resultaron positivas el 13,3%. No obstante los resultados están en concordancia con Hamond et al. (2015) quienes utilizaron PCR-lipL32 en muestras de orina de vacas antes de ingresar al matadero y obtuvieron 33,6% de positividad. Murray y col. (2009) indican que la bacteria se instaura en los túbulos

proximales del glomérulo renal, se replica y permanece allí por largos períodos de tiempo excretándose al medio ambiente.

**Tabla No 3**  
Resultados de PCR para *Leptospira* spp. patógenas amplificadas con los marcadores G1-G2 e Internal 1-Internal 2 en muestras de orina de búfalas (*Bubalus bubalis*)

| RESULTADO                       | Marcador G1-G2 |         | Marcador I1-I2 |           |
|---------------------------------|----------------|---------|----------------|-----------|
|                                 | A              | B       | A              | B         |
| POSITIVO <i>Leptospira</i> spp. | 14 (36,9%)     | 8(25%)  | 3 (7,8%)       | 4(12,5%)  |
| NEGATIVO <i>Leptospira</i> spp. | 24 (63,1%)     | 24(75%) | 35 (92,1%)     | 28(87,5%) |
| TOTAL                           | 38             | 32      | 38             | 32        |

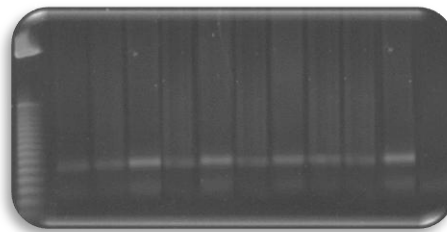


Figura 2. Gel de agarosa al 2% de productos de PCR de muestras de orina para el marcador G1-G2. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 50 pb, carriles 2-10 observa una banda de alrededor de 285pb en muestras de orina, carril 11: Vacuna Lepto Shield®, carril 12: control Negativo.

**Tabla No 4**  
Resultados de PCR para *Leptospira* spp. patógenas amplificadas con los marcadores G1-G2 e Internal 1-Internal 2 en cultivos de orina de búfalas (*Bubalus bubalis*)

| RESULTADO                       | Marcador G1-G2 |           | Marcador I1-I2 |           |
|---------------------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|
|                                 | A              | B         | A              | B         |
| POSITIVO <i>Leptospira</i> spp. | 3 (13%)        | 5(15,6%)  | 3 (13%)        | 5(15,6%)  |
| NEGATIVO <i>Leptospira</i> spp. | 20 (87%)       | 27(84,4%) | 20 (87%)       | 27(84,4%) |
| TOTAL                           | 23             | 32        | 23             | 32        |



Figura 3. Gel de agarosa al 2% de productos de PCR de muestras de orina para el marcador I1-I2. Carril 1: Marcador de peso molecular Promega 50 pb, carriles 2-4 observa una banda de alrededor de 497 pb en muestras de orina, carril 5: Vacuna Lepto Shield®, carril 6: control Negativo.

El cultivo de muestras de tejidos del establecimiento B se identificó *Leptospira* spp. patógenas en búfalas (*Bubabulus bubalis*), mediante la técnica PCR en el 100% de los

animales, amplificando al menos un marcador y al menos una muestra de tejido, muestra de orina o cultivo de orina (Ver tabla No 5)

La manifestación clínica de la leptospirosis crónica en vacas, es el aborto y frecuentemente es el único signo clínico. Los resultados de esta investigación están en concordancia con por Hamond et al. (2015) quien estudió de biopsia de útero de yeguas con problemas de infertilidad obtuvieron 18,4% en qPCR con marcador derivado del gen LipL32. A su vez Marianelli et al. (2007) detectaron *Leptospira* spp. en riñón de 27,5% de 80 fetos *Bubalus bubalis* abortados mediante PCR y posterior secuenciación.

**Tabla No 5**

Resultados de PCR para *Leptospira* spp. patógenas amplificadas con los marcadores G1-G2 e Internal 1-Internal 2 en cultivos de útero, oviducto, riñón, muestras de orina y cultivo de orina de búfalas (*Bubalus bubalis*) Establecimiento B.

| ÓRGANO<br>MARCADOR<br>ANIMAL | ÚTERO        |              | OVIDUCTO     |              | RIÑÓN        |              | ORINA        |              | CULTIVO<br>Orina |              | TOTAL<br>POSITIVO       |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|-------------------------|
|                              | G1-G2        | I1-12        | G1-G2        | I1-12        | G1-G2        | I1-12        | G1-G2        | I1-12        | G1-G2            | I1-12        | AL MENOS UN<br>MARCADOR |
| 1                            | +            | -            | -            | +            | +            | +            | -            | -            | +                | -            | 5                       |
| 2                            | -            | +            | -            | +            | -            | -            | +            | +            | +                | -            | 5                       |
| 3                            | -            | -            | -            | +            | -            | -            | -            | -            | -                | +            | 2                       |
| 4                            | -            | +            | +            | +            | -            | -            | -            | -            | -                | +            | 4                       |
| 5                            | +            | -            | +            | -            | +            | +            | -            | +            | -                | -            | 5                       |
| 6                            | +            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | +                | -            | 2                       |
| 7                            | +            | +            | +            | -            | -            | +            | +            | -            | +                | -            | 6                       |
| 8                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +                | -            | 9                       |
| 9                            | -            | +            | +            | +            | +            | +            | -            | +            | -                | +            | 7                       |
| Total +                      | 5<br>(55,5%) | 5<br>(55,5%) | 5<br>(55,5%) | 6<br>(66,6%) | 4<br>(44,4%) | 5<br>(55,5%) | 3<br>(33,3%) | 4<br>(44,4%) | 5<br>(55,5%)     | 3<br>(33,3%) |                         |
| Total -                      | 4<br>(44,4%) | 4<br>(44,4%) | 4<br>(44,4%) | 4<br>(44,4%) | 5<br>(55,5%) | 4<br>(44,4%) | 6<br>(66,6%) | 5<br>(55,5%) | 4<br>(44,4%)     | 6<br>(66,6%) |                         |

Los resultados de histopatología 5/9 úteros con endometrios con fibrosis temprana. Los 9 oviductos presentan arquitectura histológica conservada. y 6/9 riñones muestran multifocos inflamatorios a predominio linfoplasmocitario a nivel intersticial. Se ha demostrado la presencia de leptospiras en placenta de vacas experimentalmente infectadas, en útero y oviducto de vacas vacías Ellis et al. (1977) Ellis et al. (1986). La localización de leptospiras en útero preñado y no preñado de vacas se ha demostrado que persiste por más de 142 y 97 días post infección respectivamente Ellis W (1994).

**Tabla No 6**

Resultados de histopatología de muestras de útero, trompa de Falopio, riñón, de 9 búfalas (*Bubalus bubalis*) Establecimiento B.

| ÓRGANO<br>ANIMAL | ÚTERO          | TROMPA | RIÑÓN |
|------------------|----------------|--------|-------|
|                  | HISTOPATOLOGÍA |        |       |
| 1                | 2              | 6      | 7     |
| 2                | 3              | 6      | 8     |
| 3                | 4              | 6      | 9     |
| 4                | 4              | 6      | 9     |
| 5                | 4              | 6      | 9     |
| 6                | 1              | 6      | 9     |
| 7                | 5              | 6      | 9     |
| 8                | 4              | 6      | 9     |
| 9                | 4              | 6      | 8     |

**Leyenda**

1. Endometrio con arquitectura histológica conservada 2. Endometrio no productivo. Hay infiltrado linfoplasmocitario inter glandular 3. Endometrio con edema no inflamatorio. Se observa fibrosis temprana 4. Endometrio con fibrosis temprana 5. Endometrio no productivo 6. Epitelio con arquitectura histológica conservada 7. Arquitectura histológica conservada 8. Se observa un foco inflamatorio linfoplasmocitario a nivel intersticial 9. Se observan multi focos inflamatorios a predominio linfoplasmocitario, a nivel del compartimiento intersticial.

## Conclusión

Fue posible bajo la metodología de esta investigación realizar aislamientos e identificación molecular de *Leptospira* spp. patógenas en muestras de orina, muestras de tejido uterino y tejido renal provenientes de búfalas (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectadas en dos establecimientos de Venezuela lo que permite afirmar que la leptospirosis es una enfermedad silenciosa, que debe ser atendida ya que en el 100% de las muestras de tejido hubo identificación molecular de la bacteria, a su vez se detectó en muestras de orina y cultivos de muestras de orina, la presente investigación contribuye a entender las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en infecciones naturales a su vez, reporta el primer aislamiento de *Leptospira* spp. patógenas en el tracto genital (útero y oviducto) y riñón en búfalas (*Bubalus bubalis*) de Venezuela empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los marcadores G1-G2 e Internal 1-Internal 2. Se evidencia que la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil y con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de leptospirosis en búfalas. Esta investigación sugiere ampliar los estudios de leptospirosis en búfalas con métodos moleculares de diagnóstico.

## Agradecimientos

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia, en Centro Diagnóstico Veterinario Rosaura Pérez Gil, fue financiado por las siguientes Agropecuarias: La Hechicera, Búfalos del Sur, San Buenaventura y Lourdes. Los autores agradecemos al Ing. Álvaro Galvis por su colaboración en las necropsias de úteros y al Prof. Dr. Gustavo Bracho por procesar las histopatologías de los órganos.

## Referencias

- Cheemaa PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H and Sandey M. 2007.** Detection of pathogenic leptospire in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. Indian Journal of Experimentally Biology. 45 (6) 568-573.
- Chideroli R, Pereira U, Goncalvez D, Nakamura A, Alfieri A.A, Alfieri A.F, and Freitas J. 2016.** Isolation and molecular caracterización of *Leptospira borgpetersenii* serovar Harjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. Genetics and Molecular Research 15 (1) gmr. 15018473.
- Ellis W. and Michna S. 1977.** Bovine Leptospirosis: Experimental Infection of Pregnant Heifers With a Strain Belonging to the *Hebdomadis* Serogrup. Research in Veterinary Science. 22:229 – 236.
- Ellis W. and Thiermann A. 1986.** Isolation of Leptospire from the Genital Tracs of Iowa Cows. American Journal of Veterinary Research. 47:1694-1696.
- Ellis W. 1994. Leptospirosis as a cause of Reproductive failure.** Veterinary Clinics of North America Vol 10 (3) 463-475.

- González F y Rivera S. 2015.** Caracterización de la Leptospirosis bovina en Venezuela. Revisión breve sobre la enfermedad. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria. 16(2): 1-22.
- Gravekamp C, Van de Kem H, Franzen M, Carrington D, Schoone G, Van Eys G, Everard C, Hartskeerl R and Terpstra W. 1993.** Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets primers. Journal of General Microbiology. 139: 1961-1700.
- Haake D, Chao G, Zuerner R, Barnett J, Barnett D, Mazel M, Matzunaga J, Levett P And Bolin C. 2000.** The Leptospiral Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. Infection and Immunity. 68(4):2276-2285.
- Hamond C, Pestana C, Rocha-de-Souza C, Cunha L, Brandão F, Medeiros M and Lilenbaum W. 2015.** Presense of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. Veterinary Microbiology. XXX 7018, 6 p.
- Horton K, Wasfy M, Samaha H, Abdel-Rahman B, Safwat S, Abdel Fadeel M, Mohareb E and Dueger E. 2014.** Serosurvey for Zoonotic Viral and Bacterial Pathogens Among Slaughtered Livestock in Egypt. Vector Borne Zoonotic Dis. 14 (9) p 633-639.
- Jafari A, Shahbazkia H and Ronag N. 2001.** Evaluation of patogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. Iranian Journal of Microbiology, 3 (3) 135-139.
- Konrad J, Camoero I, Caspe G, Brihuega B, Draghi G, Moore D, Crudelli G, Venturini M and Campero C. 2013.** Detection of antibodies aganinst *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in wáter buffaloes in the Northeas of Argentina. Tropical Animal Health Production. DOI 10.1007/s11250-013-0427-y.
- Motta J, Clavijo J, Waltero I, Abeledo M. 2014.** Prevalencia de anticuerpos de *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* en hatos bovinos y bubalinos en el departamento del Caquetá, Colombia. Revista Salud Animal 36(2) 80-89.
- Murray G., Srikram A., Henry R., Puapairoj A., Sermswan R., Adler B. 2009.** *Leptospira Interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. Microbes and infection. 11:311-314.
- Priyantha M, Gunawardana G, Puvanenderan S, Wijemuni M and Alwis, P. 2010.** Serological Detection of *Leptospira* Serovars from aborted Water Buffaloes in Sri Lank. 9th World Buffalo Congress. P 480-483.
- Quaresma M., Barbosa E., Kota Couri M. 2008.** Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. The Veterinary Journal 178: 251-256.
- Suwanchaoen D, Limlertvatee S, Chetiyawan P, Tongpan p, Sangkaew N, Sawaddee Y, Inthakan K and Wiratsudakul A. 2016.** A nationwide survey of pathogenic leptospires in urine of cattle and buffaloes by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in Thailand, 2001-2013. Journal of Veteterinary Medical Science. ISSN: 0916-7250.
- Villanueva M, Mingala C, Gloriani N, Yanagihara, Norikazu I, Nakajima Ch, Suzuki Y and Koizumi N. 2016.** Serological investigation of *Leptospira* infection and its circulation in one intensive-type wáter buffalo farm in the Philipines. Japanese Journal of Veterinary Research 64 (1) p 15-24.