

Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes

Publicación Científica de la Asociación Argentina de Zoonosis

Volumen IX • Nº 2 • Junio 2014



AAZ

25 años 1989-2014

Diagnóstico molecular y serológico de leptospirosis humana en la provincia de Buenos Aires, Argentina

Mariana Recavarren¹, Exequiel Scialfa², Mariana Rivero³ y Silvina Quintana⁴

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue aplicar la técnica de PCR en tiempo real para detectar ADN de los serovares más comunes de leptospirosis que infectan humanos a partir de cultivos puros de referencia, y de sueros de pacientes en distintas etapas de infección. Se realizó extracción, amplificación y cuantificación del ADN de cultivos puros de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. La sensibilidad de la PCR en tiempo real *in vitro* fue en promedio de 8 genomas. A partir de 23 muestras de sueros de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis se determinó por la técnica de aglutinación microscópica (MAT) la presencia de anticuerpos, y por PCR en tiempo real con dos pares de cebadores diferentes, la presencia de ADN bacteriano. En el período agudo de la enfermedad (1 a 7 días) MAT fue positivo en 9/10 muestras y PCR en tiempo real en 8/10. Fue llamativo que 3/4 muestras de período tardío (superior a 14 días) fueran PCR positivas, lo cual no concuerda con la patogenia aceptada para la leptospirosis. Debido a estas consideraciones, por el momento, y en nuestro medio, la utilidad de la técnica de PCR es complementaria a la MAT y no debe reemplazarla.

Palabras claves: Leptospirosis humana, MAT, PCR en tiempo real.

Molecular and serologic diagnosis in human leptospirosis (Buenos Aires province, Argentina)

Abstract. The aim of this study was to apply the technique of real-time PCR to detect DNA of the most common *Leptospira* serovars that infect humans from pure cultures of reference, and sera from patients at different stages of infection. Extraction, amplification and quantification of DNA from pure cultures of *Leptospira interrogans* serovars *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Hardjo* and *Pyrogenes* performed; *Leptospira* serovars *borgpeterseni* *Tarassovi*, *Wolffi* and *Castellonis* and *Leptospira* serovar *kirschneri* serovar *Grippotyphosa*. The *in vitro* sensitivity of real-time PCR averaged 8 genomes. From 23 serum samples from patients suspected of leptospirosis the presence of antibodies was determined by microscopic agglutination technology (MAT), and the presence of bacterial DNA by real-time PCR with two different primer pairs. In the acute stage of the disease (1-7 days) MAT was positive in 9/10 samples and real-time PCR in 8/10. It was interesting that 3/4 of late period samples (over 14 days) were PCR positive, which is inconsistent with the accepted pathogenesis for leptospirosis. Because of these considerations, for the moment, and in our field, the usefulness of the PCR technique is complementary to the MAT and should not replace it.

Key words: Human Leptospirosis, MAT, Real Time PCR.

Introducción

La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico serológico de la leptospirosis es la técnica de aglutinación microscópica con antígenos vivos de leptospirosis (MAT). Esta prueba es altamente específica pero presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de los 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero (convaleciente) para confirmar el caso. El urocultivo es de utilidad en pacientes con más de una semana de evolución de la enfermedad, no obstante la técnica de siembra es dificultosa y

compleja por requerir semanas de desarrollo², por su bajo pH, y por ser una muestra que generalmente se contamina dificultando el desarrollo de leptospirosis o la observación de las mismas por microscopía de campo oscuro³.

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de las enfermedades infecciosas, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco del ADN que se quiera detectar en distintas muestras clínicas. Los métodos moleculares, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), emplean secuencias específicas que han permitido la identificación de especies de bacterias así como el diagnós-

1. Área de Veterinaria del Instituto de Análisis Bioquímicos Fares Taie.

2. División Zoonosis Rurales Azul, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

3. Escuela Superior de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

4. Área de Biología Molecular del Instituto de Análisis Bioquímicos Fares Taie.

veterinaria@farestaie.com.ar

Enviado: 3-01-14
Aprobado: 15-04-14

tico de infecciones agudas. La PCR en tiempo real, es una amplificación selectiva de una región elegida dentro de una molécula de ADN que se va cuantificando con marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción; además, permite la detección directa del agente en etapa aguda de la enfermedad con alta especificidad y sensibilidad en forma rápida (2 horas), y a gran escala.

El presente trabajo tuvo por objetivo aplicar la técnica de PCR en tiempo real para detectar ADN de los serovares más comunes de leptospira que infectan humanos, a partir de muestras de suero de pacientes con diferentes estadios de evolución. Además, se compararon los resultados de la PCR en tiempo real con los obtenidos por la serología convencional.

Materiales y métodos

Muestras de sueros de pacientes con sospecha de leptospirosis: se estudiaron 23 muestras de suero de pacientes con sintomatología y epidemiología de leptospirosis provenientes de diferentes municipios de la provincia de Buenos Aires. Estas muestras pertenecían a pacientes con 1-19 días de evolución de la enfermedad. Las muestras se conservaron a -20°C previo a su análisis para la detección de anticuerpos por la reacción de MAT y del ADN por PCR en tiempo real.

Diagnóstico serológico (MAT): Se utilizaron cepas de referencia de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa, vivas desarrolladas a 28-30°C en medio EMJH y con no más de 15 días de crecimiento. Toda muestra con resultado positivo a títulos mayores a 1:50 fue considerada positiva; a los positivos se les realizaron diluciones al doble hasta su negativización.

Se consideró como caso probable a aquellos pacientes con clínica y epidemiología compatible con leptospirosis, y con un resultado positivo a MAT. Definición de caso confirmado: toda primera muestra positiva con MAT donde se observaron títulos elevados (mayor e igual a 1:400) para uno o más serovares, donde no fue posible demostrar la conversión serológica por situarse la muestra en la meseta de la respuesta inmune. Pacientes en donde se demostró la conversión serológica en muestras pareadas (aumento cuádruple en la tasa de anticuerpos para un serovar). Sueros positivos a uno o dos serovares con títulos de 1:50 a 1:200 donde no se demostró seroconversión, fueron considerados por infección pasada.

Puesta a punto de la técnica de PCR: Se utilizaron cultivos de cepas de referencia de *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Hardjo; *Leptospira borgpeterseni* serovares Tarassovi, Wolffi y Castellonis y *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa, siendo los más frecuentes en el diagnóstico serológico de muestras de pacientes humanos en nuestra región⁴.

Extracción de ADN: Se realizó la extracción de ADN mediante el *kit comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Purification* (Axygen, Tewksbury MA, USA) a partir de cultivos puros y de las muestras de suero de pacientes. Se cuantificó la cantidad de ADN presente en cada extracción mediante el *kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Estudios moleculares

Todas las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania), en un volumen final de 20 µl, utilizando Eva Green como intercalante fluorescente (KAPA HRM FAST, Biosystems, Woburn, USA). En las reacciones de amplificación se usaron 4 µl del ADN extraído, con 10 µl de mezcla KAPA HRM FAST 2X, con una concentración final de cebadores de 0.8 µM.

Para el control interno de la PCR y a fin de corroborar la correcta extracción de ADN y la ausencia de inhibidores en las muestras, se efectuaron amplificaciones por PCR en tiempo real de un fragmento de 99 pb del gen de la beta actina humana (Tabla 1). El programa de ciclado para la detección del gen de la beta actina consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 54°C y 20 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la temperatura de melting (Tm) del amplicón específico de 84.5 °C, según se determinó empíricamente en el presente trabajo. Se consideraron aptas para el estudio sólo aquellas muestras cuyo valor de Ct (del inglés *Cycle Threshold*) de beta actina fuera menor a 35.

PCR para la detección de ADN leptospira: Se llevaron a cabo reacciones de PCR en tiempo real para detectar ADN de leptospira, utilizando los cebadores LipL32-270F y LipL32-692R que amplifican un fragmento de 423 pb y los cebadores Lepto F y Lepto R que generan un amplicón de 87 pb a partir de ADN de *Leptospira spp* (Tabla 1). El programa de ciclado para la detección de *Leptospira* con los cebadores LipL32-270F y LipL32-692R descritos por Levett et al⁵ consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C,

20 segundos a 64°C y 30 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la T_m de 86 °C. El programa de ciclo para la PCR en la cual se emplearon los cebadores Lepto F y R consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95°C y 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 50°C y 20 segundos a 72°C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de melting, siendo la T_m específica del amplicón de 87°C. En ambas reacciones de detección se consideraron positivas aquellas muestras con valores de Ct <40, en las cuales se corroboró la amplificación específica del amplicón por el análisis de melting.

Resultados

Se logró extraer y amplificar exitosamente el ADN de los cultivos de los diferentes serovares de *Leptospira*. Los cebadores Lepto F/R (reverso y anteverso) amplifican un fragmento de 87 pb del gen 16S⁶ mientras que los cebadores LipL32-270F/LipL32-692R amplifican un fragmento de 423 pb del gen LipL32⁵. Con los cebadores descritos por Levett et al. no fue posible amplificar ADN de *Leptospira Kirschneri* serovar Grippotyphosa. Se calculó la sensibilidad analítica con ambos pares de cebadores (n° de genomas detectados a partir de los cultivos puros)⁵, siendo las mismas similares a las descritas en los trabajos originales. La sensibilidad fue calculada con algunos de los serovares estudiados, realizando diluciones seriadas de ADN de concentración conocida y analizando las mismas por PCR en tiempo real con ambos pares de cebadores. La sensibilidad calculada para los serovares Canicola, Pomona, Pyrogenes, Ballum e Icterohaemorrhagiae fue en promedio de 8 genomas. Las eficiencias de reacción para todos los serovares fueron semejantes (>90%). En la Figura 1 se muestran a modo de ejemplo todas las realizadas, (A) curvas de sensibilidad de los cebadores que amplifican un fragmento de 423pb con el serovar Canicola y (B) de los cebadores que generan un amplicón de 87pb con el serovar Pomona, respectivamente.

Asimismo se estudió la especificidad de ambos pares de cebadores con ADN de otras bacterias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus sp*, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus sp*, *Brucella abortus*) en la cual en ninguno de los casos se amplificó el fragmento específico de 87 y 423 pb, respectivamente (Figura 1C).

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados del total de las muestras analizadas (Tabla 2) y la frecuencia de positividad de cada una de las técnicas de acuerdo al período de evolución de la enfermedad (Tabla 3). En la etapa aguda de la enfermedad MAT fue positiva en el 90 % contra 80% de PCR en tiempo real, con los cebadores que amplifican un fragmento de 87pb. Dos muestras de esa etapa correspondían a pacientes cursando el sexto día de evolución de la enfermedad y fueron MAT positivas y PCR negativas. Todas las PCR positivas lo fueron con el cebador que amplifica 87 pb, excepto la número 22 (Tabla 2).

Las muestras número 9 y 10 corresponden a la misma persona tomada la 9 en período agudo de la enfermedad (día 1, bacteriemia) con resultado de MAT negativa y PCR positiva y la 10 en el día 16 (período convaleciente), siendo positiva a MAT y PCR. Una de las muestras (N°:14) no fue apta para el estudio de detección de ADN dado que el valor de Ct para la beta actina humana fue mayor a 35.

Discusión

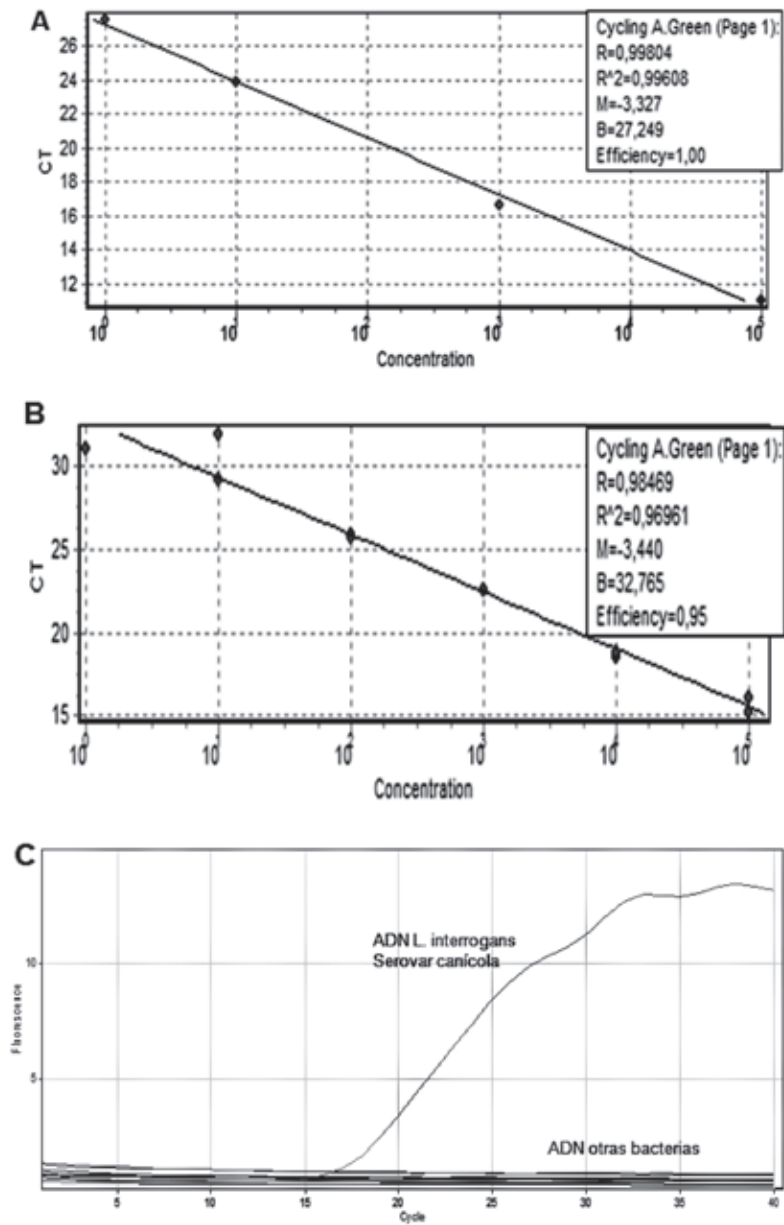
La sensibilidad obtenida por la PCR en tiempo real *in vitro*, calculada a partir de los cultivos puros, fue en promedio menor a 8 genomas con ambos pares de cebadores. Estos resultados se asemejan a los de Levett et al⁵ quienes encontraron límites de detección de 3 genomas a partir del cultivo puro de *Leptospira interrogans*. En muestras de suero y orina de pacientes hallaron límites de detección de 2 y 10 genomas, respectivamente⁶. Es posible que utilizando sangre total o plasma mejore la sensibilidad de la técnica, de acuerdo a Bourhy et al¹⁰.

Las técnicas de PCR descritas previamente para la detección de ADN de *Leptospira* carecen de un control interno de amplificación para detectar inhibición de la PCR⁵⁻⁷. Sin embargo está descrito que los controles de amplificación interna son mandatorios cuando se realizan pruebas diagnósticas basadas

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio, secuencia, gen blanco, tamaño del amplicón

Primer	Secuencia 5'-3'	Gen blanco	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Lepto F	CCC GCGTCCGATTAG	16S	87	Smythe y col, 2002
Lepto R	TCCATTGTGGCCGRACAC	16S		
LipL32-270F	CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT	LipL32	423	Levett y col, 2005
LipL32-692R	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT	LipL32		
beta actina 99 fw	TGCGTGACATTAAGGAGAAG	beta actina	99	diseñados en este estudio
beta actina 99 rv	GCTCGTAGCTCTCTCCA	beta actina		

Figura 1. Validación de las técnicas de PCR en tiempo Real con cultivos puros



A. Curva standard del serovar *Canicola*, amplificación por PCR en tiempo real con los cebadores que amplifican un fragmento de 423 pb a partir de diferentes cantidades de genomas del serovar canícola 8×10^6 , 8×10^4 , 8×10^2 , 8. **B.** Curva standard del serovar *Pomona*, amplificación por PCR en tiempo real con los cebadores que amplifican un fragmento de 87 pb a partir de diferentes cantidades de genomas del serovar *Pomona* 8×10^6 , 8×10^4 , 8×10^2 , 8 y 0,8. **C.** La especificidad de la PCR en tiempo real con los cebadores amplifica un fragmento de 423 pb para la detección de ADN de *Leptospira* spp. Reacciones de PCR en tiempo real utilizando como molde de ADN del serovar *Canicola* y ADN de otras bacterias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* sp, *Bacillus cereus*, *Rhodococcus equi*, *Brucella abortus*). La fluorescencia normalizada (delta Rn) se representa en función del número de ciclos para la amplificación de ADN de *Leptospira* spp.

en PCR⁸. Dado que el suero es una fuente conocida de inhibidores de la PCR, es importante que las pruebas basadas en la PCR incluyan un control interno, ya que una respuesta negativa (no se genera amplificación), puede significar que no está presente ninguna secuencia diana en la reacción; pero también podría

significar que la misma se inhibe debido al mal funcionamiento del termociclador, mezcla de PCR inadecuada, pobre actividad de la polimerasa o por la presencia de sustancias inhibitoras en la matriz de la muestra⁹. Esto permitió descartar 1 muestra de las 23 analizadas.

Tabla 2. Comparación de muestras de suero de pacientes por MAT y PCR en tiempo real en distintas etapas de la enfermedad

Muestra	Días de evolución	MAT	PCR 423 pb	PCR 87 pb
1	5 (1° muestra del 1)	1:50 Taras.	Positiva	Positiva
2	9 (2° muestra del 2)	1:100 Sejr, 1:200 Canic-Ictero, 1:800 Taras.	Negativa	Negativa
3	10	1:100 Bal-Canic-Sejr, 1:800 Taras.	Negativa	Negativa
4	9	1:50 Bal-Ictero-Canic, 1:100 Sejr-Grip, 1:400 Taras.	Positiva	Positiva
5	6	1:50 Ictero, 1:100 Bal-Grip, 1:400 Taras, 1:200 Canic.	Negativa	Negativa
6	8	1:100 Canic, 1:200 Taras.	Negativa	Negativa
7	4	1:50 Grip-Ictero 1:100, Sejr, 1:200 Canic, 1:400 Taras.	Negativa	Positiva
8	8	1:200 Grip-Bal, 1:400 Canic-Taras.	Negativa	Negativa
9	1 (1° muestra del 9)	negativo	Negativa	Positiva
10	16 (2° muestra del 9)	1:50 Hard, 1:400 Ictero.	Positiva	Positiva
11	6	1:200 Bal-Canic-Ictero.	Negativa	Negativa
12	4	1:100 Taras, 1:200 Canic-Grip, 1:400 Bal.	Positiva	Positiva
13	7	1:50 Canic-Grip-Ictero-Bal, 1:100 Pyr, 1:400 Taras.	Positiva	Positiva
14	8	1:100 Bal-Grip-Ictero-Pyr, 1:50 Can, 1:400 Taras.	No apta	No apta
15	19	1:200 Bal-Can-Grip-Taras.	Negativa	Positiva
16	19	1:50 Sejr, 1:200 Bal-Canic-Taras, 1:400 Grip.	ND	Positiva
17	12	1:50 Bal.	Negativa	Positiva
18	7	1/50 Ictero-Taras.	Positiva	Positiva
19	6	1/200 Sejr, 1/400 Canic, 1/800 Bal-Grip-Taras.	Negativa	Positiva
20	5	1/200 Pyr-Sejr, 1/100 Pom, 1/800 Taras, 1/50 Ictero. 1/1600 Bal-Grip-Canic.	Negativa	Positiva
21	15	1/200 Taras, 1/100 Canic-Ictero, 1/400 Bal.	Negativa	Negativa
22	Desconocido	1/800 Hard, 1/400 Sejr, 1/200 Taras.	Positiva	Negativa
23	Desconocido	1/100 Ictero, Canic-Taras, 1/50 Bal.	Negativa	Positiva

ND: No determinado; No Apta: negativa al control interno (Ct beta actina humana < 35).

Canic: *Canicola*, Grip: *Grippotyphosa*, Ictero: *Icterohaemorrhagiae*, Bal: *Ballum*, Pyr: *Pyrogenes*, Taras: *Tarassovi*, Hard: *Hardjo*, Sejr: *Sejroe*.

Tabla 3. Comparación de los resultados entre MAT y PCR en tiempo real y discriminando dos pares de *primes*, en 23 muestras de sueros, según período de evolución

Período de evolución y número de muestras	Muestras MAT	CR positivas utilizando P fragmento de 432bp	PCR positivas utilizando fragmento de 87bp	Muestras PCR positivas
1-7 días (n=10)	9 (90%)	4 (36.4%)	8 (80%)	8 (80%)
8-14 días (n=7)	7 (100%)	1 (14.3%)	2 (28.6%)	3 (28.6%)
14 o más (n=4)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)
sin datos (n=2)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)

Siete de las muestras clínicas analizadas resultaron positivas con la PCR de 87 pb y negativas por la PCR de 423 pb (muestras 7, 9, 15, 17, 19, 20 y 23, Tabla 2). Se atribuye esta falta de amplificación con los cebadores de 423 pb a los altos niveles de degradación que suelen presentar este tipo de muestras que son almacenadas y transportadas desde centros de salud lejanos, en muchos casos sin la refrigeración adecuada. Por esta razón es importante, para la realización de un correcto diagnóstico molecular, la utilización de cebadores que amplifiquen fragmentos menores a 300 pb para no tener resultados falsos negativos debido a la alta degradación del ADN de la muestra. En el caso de la muestra 22 (cuyo período evolutivo desconocíamos), la PCR con los cebadores que amplifican un fragmento de 423 pb, fue positiva, mientras que no hubo amplificación con los cebadores que generan un amplicón de 87pb, lo cual destaca la importancia de la utilización de combinaciones de cebadores que amplifiquen diferentes regiones genómicas, para su correcto diagnóstico molecular, como se ha descripto anteriormente¹⁰.

Si bien se detectó por PCR 1 paciente que fue negativo en el período agudo con MAT, dos muestras pertenecientes a pacientes cursando el sexto día de evolución de su enfermedad fueron MAT positivas y PCR negativas. Es claro que el MAT fuera negativo, ya que por la evolución (un día) no existen anticuerpos detectables, no así la negatividad de la PCR, que era de esperar positiva, no concordando estos resultados con los de Brown¹¹ y Gravekamp¹² los cuales afirman que el principal valor de la PCR es la habilidad de obtener un diagnóstico definitivo durante el estadio agudo de la enfermedad. Sin embargo, fue llamativo que 3/4 muestras de período tardío (superior a 14 días) fueran PCR positivas, lo cual no concuerda con la patogenia aceptada para la leptospirosis, sobre lo que no tenemos explicación, pero abre interesantes interrogantes a investigar. Debido a estas consideraciones, por el momento, y en nuestro medio, la utilidad de la técnica de PCR es complementaria a la MAT y no debe reemplazarla. Es necesario estudiar más muestras, mejorando los procedimientos empleados, teniendo en cuenta las dificultades del envío y conservación de los materiales clínicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Zoonosis Rurales de Azul, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires por la cesión de los cultivos puros de bacterias y los sueros de pacientes. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica mediante su instrumento FONTAR por la financiación de proyecto.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés respecto al trabajo de investigación, a la autoría, a la publicación, a la financiación de trabajo ni conflictos personales que podrían influenciar de forma negativa al presente trabajo.

Bibliografía

- Cardona M, Moros R, López E, Pérez J, Hernández R. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2008; 28: 24-30.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *The Journal of infectious diseases*. 1995; 172: 281-5.
- McDonough P. Leptospirosis en caninos-estado actual. In: Carmichael L (Ed.): *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, IVIS, Ithaca, New York: International Veterinary Information Service, 2001, p 6.
- Scialfa E, Gallicchio O y Benitez M. Leptospirosis humana en la provincia de Buenos Aires, Argentina, período 2000-2009. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes, Asociación Argentina de Zoonosis, Bs. As. 8 al 10 de Junio de 2011, LR p160.
- Levett P, Morey R, Galloway R, Truner D, Steigerwalt A, Mayer L. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 45-9.
- Smythe, L, Smith, I, Smith, G, Dohnt, M, Symonds, M, Barnett, L and McKay, D. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *Infectious Diseases*. 2002; 2: 13.
- Ahmed A, Engelberts M, Boer K, Ahmed N and Hartskerl R. Development and validation of a Real-Time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* Species in clinical materials. *Plos One* 2009; 4 (Issue 9), e7093.
- Hoofar J, Cook N, Malorny, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR. *J Clinical Microbiol*. 2003; 41: 5835
- Burd, E. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(3): 550-76.
- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 2154-60.
- Brown P, Gravekamp C, Carrington H et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 1995; 43: 110-14.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of cebadores. *Journal of General Microbiology* 1993; 139: 1691-1700.