

Estandarización de una Técnica de PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan para la Detección de *Leptospira* spp Patógenas en Orina de Canes Domésticos

STANDARDIZATION OF A REAL TIME PCR TAQMAN ASSAY FOR DETECTION OF PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* SP IN URINE OF DOGS

André Sedano S.¹, Chris E. Pinto J.¹, Juan Siuce M.¹, Sonia Calle E.^{1,2}

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar una técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan para detectar la presencia de leptospiras patógenas en orina de perro infectada *in vitro* con cepas patrón de *Leptospira* sp. Las muestras fueron obtenidas de un perro clínicamente sano y negativo a la prueba de microaglutinación. Se utilizaron los cebadores Lepto R y Lepto F, específicos para *Leptospira* sp y una sonda TaqMan Lepto probe que amplifican e hibridan, respectivamente, una porción del gen *rrs*, capaces de diferenciar entre especies patógenas y no patógenas de *Leptospira*. Se estandarizó el protocolo de PCR en 35 ciclos, con un proceso de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida por una desnaturalización a 95 °C por 15 s y finalmente el alineamiento y extensión en un solo paso a 60 °C por 1 min. Los valores de ciclo umbral (Ct) determinados durante la estandarización de la PCR estuvieron en un rango de 12.53 a 18.21 para las 25 cepas patógenas de *Leptospira* sp, en tanto que las cepas saprófitas y otras bacterias no dieron productos específicos. El estándar fue detectado hasta una dilución de 10² con un Ct de 29.98 a una eficiencia de 1.13 y con un coeficiente de correlación (R²) de 0.993. Se detectó ADN en las muestras de orina infectada desde la dilución de 10⁷ leptospiras/ml con un valor de Ct de 17.54 hasta una mínima dilución de 10² leptospiras/ml con un valor de Ct de 29.87.

Palabras clave: canes domésticos, PCR en tiempo real, sondas TaqMan, *Leptospira* sp, leptospirosis, orina

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² E-mail: calleson@gmail.com

Recibido: 1 de febrero de 2015

Aceptado para publicación: 20 de agosto de 2015

ABSTRACT

This study aimed to standardize a TaqMan Real-Time PCR assay to detect the presence of pathogenic leptospires in urine samples of a dog infected *in vitro* with standard strains of *Leptospira* spp. Samples were obtained from a clinically healthy dog, negative to the microagglutination test. Lepto R and Lepto F primers, specific for *Leptospira* sp and a Lepto TaqMan probe were used, which amplified and hybridized respectively a portion of the *rrs* gene, differentiating between pathogenic and nonpathogenic species of *Leptospira*. Thermocycling program was standardized with 35 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min with an initial cycle of 95 °C for 5 min. Cycle threshold (Ct) values determined during the standardization of PCR were from 12.53 to 18.21 for the 25 pathogenic strains of *Leptospira* sp. In contrast, saprophytic *Leptospira* and other species of bacteria did not produce any specific Ct value. The standard strain was detected up to a dilution of 10² with a Ct value of 29.98 at an efficiency of 1.13 and a correlation coefficient (R²) of 0.993. DNA was detected in infected urine samples from the dilution of 10⁷ leptospires/ml with a Ct value of 17.54 to a minimum dilution of 10² leptospires/ml with a Ct value of 29.87.

Key words: domestic canines, real time PCR, TaqMan probe, *Leptospira* sp, leptospirosis, urine

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de gran impacto en la salud pública. Es causada por bacterias del género *Leptospira*, que afectan al hombre y a casi todas las especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, siendo los roedores los principales reservorios. Existen más de 200 serovares (Acha y Szyfres, 2003; WHO e ILS, 2003; Navarrete *et al.*, 2006; OMS, 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

La leptospirosis es considerada una enfermedad endémica, epidémica y reemergente. Se reportan más de 500,000 casos severos anuales con tasas de mortalidad entre el 10 y el 40% (Hartskeel *et al.*, 2001; Hartskeel, 2005; OMS, 2008). En el Perú, a partir de 2011 se ha observado un incremento de casos, especialmente en 2012 y 2013, con brotes en los departamentos de Loreto y San Martín (Vargas, 2014). Sin embargo, la carga real de la enfermedad está subestimada debido a la deficiente vigilancia epidemiológica, dificultad de diagnóstico y baja

sensibilidad de las pruebas diagnósticas convencionales (McBride *et al.*, 2005).

El hombre generalmente se infecta por contacto directo con la orina de animales infectados o indirectamente a través del suelo y agua contaminada con esta orina (Levett, 2001; OMS, 2008). La leptospirosis ha sido tradicionalmente catalogada como enfermedad ocupacional y de ambientes rurales, pero está emergiendo como un problema urbano (Romero y Sánchez, 2009; Mendes *et al.*, 2011), donde el perro podría tener relevancia epidemiológica como reservorio, dada su estrecha relación con el hombre (Blum *et al.*, 2013).

Se han desarrollado pruebas de laboratorio mediante PCR para la detección de leptospirosis patógenas en el humano (Smythe *et al.*, 2002; Slack *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010). En la fase aguda de la enfermedad, las leptospirosis están presentes en grandes cantidades en varios fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina), de allí que se puede obtener buenos resultados en los ensayos de PCR antes de iniciar la terapia antimicrobiana

(Slack *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Villumsen *et al.*, 2010).

Los protocolos de PCR en tiempo real podrían facilitar la detección temprana de leptospiras patógenas en pacientes con síntomas clínicos sugestivos de la enfermedad, así como en la identificación de animales portadores en muestras de orina. Esto sería una ventaja frente a la prueba de aglutinación microscópica (MAT), que es el 'Gold standard' en el diagnóstico de esta enfermedad (Picardeau *et al.*, 2001), dado que MAT no es efectiva antes del séptimo día de la enfermedad (Cole *et al.*, 1973; Céspedes, 2005).

La prueba de MAT tiene, además, limitaciones en el diagnóstico de la infección crónica en animales, en el diagnóstico de abortos y en la identificación de portadores renales o genitales (OIE, 2014). Por otro lado, el cultivo bacteriano es de crecimiento lento, no menor de 13 semanas, siendo ineficaz para un diagnóstico rápido (Musso y La Scola, 2013).

Dentro de los métodos de PCR en tiempo real, en base a su fluorescencia, se encuentran los que utilizan SYBR Green, pero son menos específicos que aquellas que emplean sondas de hibridación, tales como las TaqMan (Merien *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995; Espy *et al.*, 2006). El objetivo del presente estudio fue implementar y estandarizar una técnica molecular que detecte la presencia de leptospiras patógenas en orina de canes domésticos a través de una técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), Lima.

Extracción de ADN

Se optimizaron los protocolos de extracción de ADN bacteriano a partir de cultivos de leptospiras en caldo modificado EMJH (Difco™) y a partir de la orina de un perro sano (negativo a leptospirosis a través de una evaluación clínica y serológica), infectada *in vitro* con cepas patógenas de *Leptospira* sp.

Cultivos en medio EMJH

Para la extracción de ADN se utilizaron cultivos vivos de los 25 serogrupos patógenos establecidos de *Leptospira* sp y una cepa saprófita de *Leptospira biflexa* serovar Semarang (Cuadro 1). Estas cepas fueron obtenidas de la Unidad de Espiroquetas del Instituto Pasteur (París, Francia). Los cultivos fueron utilizados a los 5-7 días de crecimiento.

Se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), siguiendo el protocolo base, diseñado por el fabricante para bacterias Gram negativas, agregando la enzima lisozima y proteinasa K en diferentes concentraciones (50 mg/ml y 10 mg/ml, respectivamente). Para la preparación de las muestras, previa a la ejecución del protocolo de extracción, se utilizaron velocidades de 3000 y 16 000 g a 20 y 25 min, respectivamente. Los productos obtenidos fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización.

Orina infectada experimentalmente

Para la extracción de ADN de la orina se obtuvieron cinco muestras (una muestra por mes) de un perro (*Canis lupus familiaris*) sano, menor de un año de edad, sin signos clínicos compatibles con leptospirosis, negativo a la prueba de MAT y sin crecimiento bacteriano en el urocultivo. Se verificó la negatividad a la prueba de MAT del donante antes de la primera muestra y luego de la última muestra, al quinto mes. La muestra fue tomada en frasco estéril durante la micción y los urocultivos se hicieron en todas las muestras de orina.

Cuadro 1. Serovares de *Leptospira* utilizados para la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real

N.º	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-bratislava
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
4	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
6	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND ¹	2011/01963
7	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 c
8	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
9	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
10	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
11	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
13	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR10
14	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
15	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945
16	<i>L. interrogans</i>	Manhao	Lincang	L14
17	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
18	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
19	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
20	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
21	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
22	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
23	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
24	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
25	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
26	<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1

¹ No determinado

La infección *in vitro* de la orina se realizó agregando 100 µl de cultivo puro conteniendo 10⁸ leptospiras patógenas de la especie *L. borgpetersenii*, serogrupo Ballum, concentración en orina que ha sido reportada por otros autores en 900 µl de orina (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Para obtener esa cantidad de leptospiras se utilizó la

equivalencia entre número de estas y la densidad óptica, tomando como referencia que una concentración de 7 x 10⁸ leptospiras/ml de EMJH es equivalente a una densidad óptica de 0.2-0.35 a 420 nm de longitud de onda (Louvel y Picardeau, 2007; Instituto Nacional de Salud, Perú, datos no publicados). El ADN de la orina infectada fue extraído utilizando el protocolo previamente optimizado.

Cuadro 2. Bacterias utilizadas en la estandarización de la PCR en tiempo real con sondas TaqMan

Especie	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pasteurella multocida</i>	NE 49

Otros géneros bacterianos

La especificidad de la técnica de PCR en la detección de *Leptospira* spp fue evaluada utilizando otros géneros bacterianos. Se cultivaron cepas patrón de los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Pasteurella* y *Escherichia* (Cuadro 2). La extracción de ADN se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

El producto de ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) por electroforesis a 90V durante 60 min y visualizado en un transiluminador Ultra Lum. Para la corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular de 50-3000 pb (GeneON, Alemania).

Estandarización de la PCR en Tiempo Real

Cebadores y sondas TaqMan

Se utilizaron los cebadores Lepto R y Lepto F, específicos para *Leptospira* spp y las sondas TaqMan Lepto probe, capaces de diferenciar entre especies patógenas y no patógenas (Smythe *et al.*, 2002).

Los cebadores Lepto F (5'¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG 3') y Lepto R (5'²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR^{A/G}ACAC3') se encuentran entre las posiciones 171 y 258 del gen *rrs* (codifica la síntesis del fragmento 16S del ARNr) y amplifican productos de 87 pb.

La sonda específica [5'²⁰⁵ (FAM) CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC²²⁸ 3 '(TAMRA)] está diseñada para hibridar una porción del segmento del gen *rrs*, generado por los cebadores Lepto F y Lepto R, solo en las leptospiros patógenas.

Condiciones de la PCR

Durante la estandarización, se utilizó ADN extraído de los 25 serogrupos patógenos como controles positivos, en diluciones de 10⁷ a 10⁰ con agua ultrapura, para determinar el grado de precisión de la prueba. La especie saprófita *L. biflexa*, los otros géneros bacterianos y el mix sin ADN fueron utilizados como controles negativos.

Para preparar el mix de PCR se utilizó el GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) a una concentración final de 1X, que incluye una polimerasa «hot start», junto con los cebadores Lepto F y Lepto R en concentraciones finales de 0.03 µM y la sonda Lepto probe a una concentración de 0.02 µM, agua ultrapura y ADN molde que representó el 10% del volumen total (2 µl). El volumen de reacción fue de 20 µl.

Se evaluaron 3 protocolos de 40, 35 y 30 ciclos, con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización a 95 °C por 15 s y un alineamiento/extensión a 60 °C por 1 min. La reacción se llevó a cabo en el sistema a tiempo real que incluye el termociclador PTC 200 (MJ Research) y el equipo Chromo-4™ (BIORAD) como lector de emisión de fluorescencia.

Análisis de los Resultados

Se analizaron los valores de Ct (ciclo de amplificación) obtenidos mediante el software Opticon Monitor 2 v. 2.0.3. La eficiencia de la amplificación promedio (E) fue determinada a partir de la pendiente obtenida de las concentraciones producidas por triplicado para el experimento utilizando la ecuación $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos ensayos de PCR en tiempo real han sido descritos para el diagnóstico de leptospirosis (Levett *et al.*, 2005; Merien *et al.*, 2005; Palaniappan *et al.*, 2005; Roczek *et al.*, 2008; Stoddard *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010), pero pocos han sido validados para su uso diagnóstico en muestras de animales (Smythe *et al.*, 2002; Slack *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009).

La sedimentación de leptospirosis para la extracción de ADN es un punto crítico en la optimización del protocolo de extracción. Por ello, se probaron protocolos de extracción con diferentes velocidades de sedimentación (3000 g por 20 min hasta 16 000 g por 25 min), encontrándose mejores resultados con la mayor velocidad y tiempo de centrifugación. Esto ya ha sido descrito por otros autores que mencionan que la extracción de ADN leptospiral es relativamente difícil debido a que las leptospirosis no sedimentan fácilmente (Faine *et al.*, 1999; Picardeau *et al.*, 2001; Serrano, 2012).

Uno de los pasos claves en el éxito en la extracción de ADN es la ruptura de la membrana de la bacteria y su protección del daño de los cristales que puedan estar presentes en la orina (Fonseca *et al.*, 2005). Por ello, se optimizó el protocolo de extracción utilizando las enzimas proteolíticas lisozima y proteinasa K, asociado a un tratamiento con calor a 37 y 55 °C, respectivamente (Verkooyen *et al.*, 1996). Se encontró que la

Cuadro 3. Valores de ciclo de amplificación (Ct) de los productos obtenidos de 25 cepas patógenas de referencia, una cepa saprófita y otros géneros bacterianos

<i>Leptospira</i>	Ct	+ / -
<i>L. interrogans</i> Canicola	12.53	+
<i>L. interrogans</i> Australis	12.59	+
<i>L. interrogans</i> Pomona	13.05	+
<i>L. kirschneri</i> Grippotyphosa	13.20	+
<i>L. interrogans</i> Autumnalis	13.21	+
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes	13.21	+
<i>L. interrogans</i> Hebdomadis	13.23	+
<i>L. licerasiae</i> Iquitos	13.25	+
<i>L. weilii</i> Celledoni	13.52	+
<i>L. kirschneri</i> Cynopteri	13.99	+
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae	14.08	+
<i>L. santarosai</i> Shermani	14.08	+
<i>L. interrogans</i> Bataviae	14.09	+
<i>L. borgpetersenii</i> Ballum	14.09	+
<i>L. noguchii</i> Louisiana	14.25	+
<i>L. weilii</i> Sarmin	14.42	+
<i>L. santarosai</i> Mini	14.63	+
<i>L. borgpetersenii</i> Tarassovi	14.65	+
<i>L. fainei</i> Hurstbridge	14.72	+
<i>L. interrogans</i> Sejroe	16.41	+
<i>L. interrogans</i> Djasiman	16.73	+
<i>L. meyeri</i> Ranarum	17.29	+
<i>L. borgpetersenii</i> Javanica	17.98	+
<i>L. interrogans</i> Manhao	18.17	+
<i>L. noguchii</i> Panama	18.21	+
<i>L. biflexa</i> Semarang	N Ct	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	N Ct	-
<i>Pasteurella multocida</i>	N Ct	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	N Ct	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	N Ct	-
<i>Escherichia coli</i>	N Ct	-

extracción del ADN mejoró al utilizar lisozima en concentración de 50 mg/ml.

A pesar que *Leptospira* sp es una bacteria Gram negativa, se requiere adicionar enzimas proteolíticas para la destrucción de la membrana y la liberación del ADN. Esto podría ser debido a la estructura de la membrana de la bacteria. Al igual que en las Gram

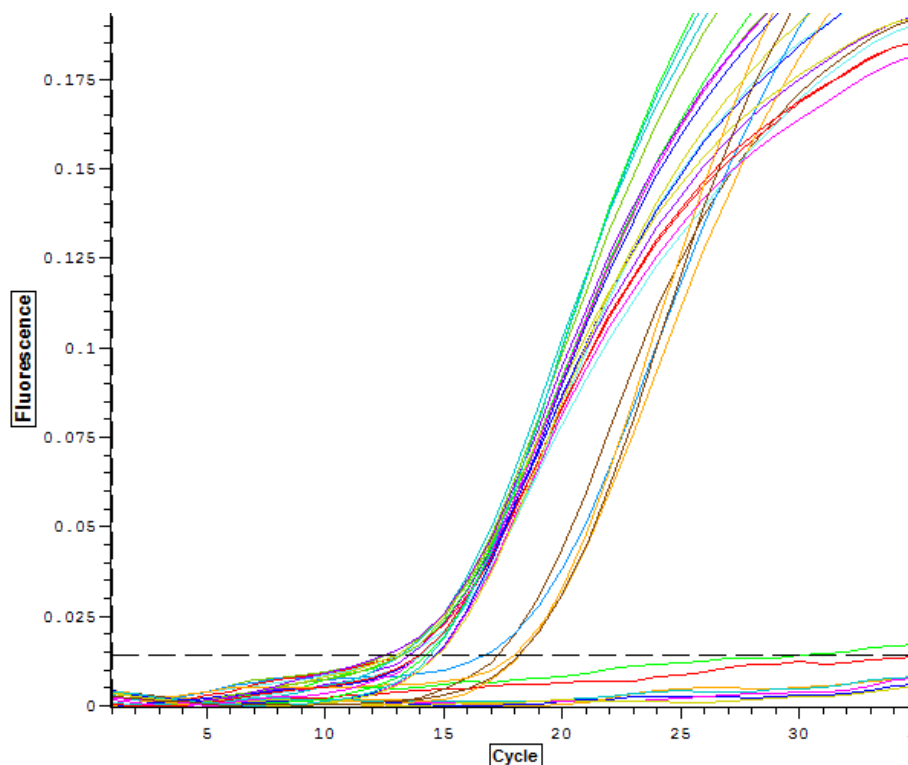


Figura 1. Valores del ciclo de amplificación (Ct) de las 25 cepas patógenas de *Leptospira* sp. Los controles positivos presentan valores de Ct entre 18.21 y 12.53, a diferencia del resto de controles negativos que no superan el umbral

positivas, la membrana citoplasmática interna de las espiroquetas está estrechamente asociada con la pared celular de peptidoglicano (Haake y Matsunaga, 2009).

En el proceso de estandarización de la PCR, los valores del ciclo de amplificación (Ct) fueron desde 12.53 hasta 18.21 para los 25 serovares patógenos de *Leptospira*, mostrando una marcada diferencia con la cepa saprófita *L. biflexa* y con los controles negativos y otros géneros bacterianos que no generaron amplificadas que excedieran el umbral, con el protocolo de 35 ciclos (Cuadro 3, Fig. 1); demostrándose de esta manera la especificidad de la prueba para detectar solo leptospiras patógenas. Por otro lado, los valores de Ct obtenidos fueron diferentes a los obtenidos por Smythe *et al.* (2002) utilizando los mismos cebadores y sonda, los cuales

obtuvieron valores de Ct entre 18.20 y 23.40 en 40 ciclos a partir de muestras de sangre de pacientes humanos (Smythe *et al.*, 2002). Estas variaciones pueden deberse a las diferentes concentraciones de ADN presentes en las muestras, así como a la naturaleza de las mismas. Otros aspectos a considerar son el uso de diferentes kits de extracción y las marcas y características de los equipos, así como diversos protocolos que pueden producir resultados variables.

Las diluciones del estándar de los cultivos de leptospira ($10^7 - 10^0$) fueron detectadas con unos valores de Ct desde 16.49, para la dilución de 10^7 , hasta 29.98 que corresponde a una dilución de 10^2 leptospiras. Este intervalo de 10^7 a 10^2 describió una curva de calibración con una eficiencia de 1.13 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.993 que

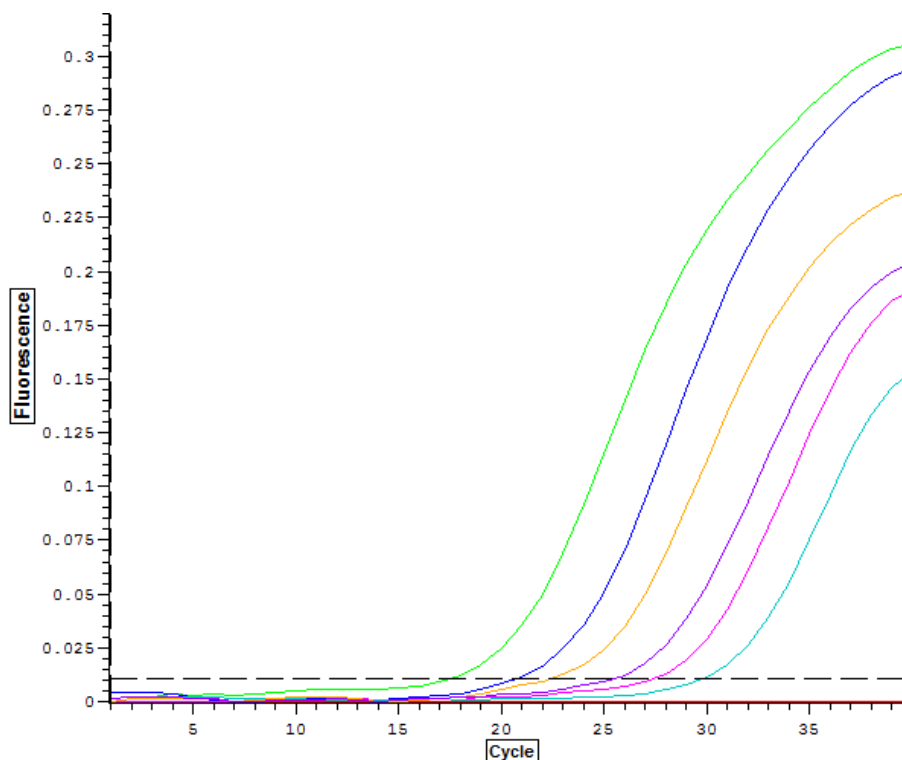


Figura 2. Valores del ciclo de amplificación (Ct) de las diluciones de la orinas infectadas con una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Ballum). Se observan las diluciones de 10^7 hasta 10^2 , siendo 10^2 el límite de detección

es lo óptimo para esta prueba (Wang *et al.*, 2012). Las diluciones de 10^1 y 10^0 con Ct de 34.05 y 34.40, respectivamente, tuvieron una curva muy débil, por lo que se consideró que mediante el protocolo implementado se cuantifica la concentración de leptospiras hasta un orden mínimo de 10^2 . Por esta razón, el protocolo de PCR se optimizó en 35 ciclos (Cuadro 4).

De la misma manera, el ADN leptospiral en las muestras de orina detectado hasta en una dilución de 10^2 leptospiras con un valor de Ct de 29.87 se encuentra en el rango del estándar (Fig. 2). Las diluciones de 10^1 y 10^0 no generaron productos específicos. El presente protocolo logró detectar ADN de *Leptospira* sp patógena a partir de una

concentración de 10^2 leptospiras/ml, el cual se determinó como el mínimo nivel de detección de la prueba.

CONCLUSIONES

- La presente técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan permite detectar cepas patógenas del género *Leptospira* en orina de canes domésticos, permitiendo detectar hasta 10^2 leptospiras/ml.
- La velocidad y el tiempo de centrifugación son factores importantes para el éxito en la extracción de ADN de *Leptospira* spp.

Cuadro 4. Valores de ciclo de amplificación (Ct) de los productos obtenidos en PCR tiempo real de las diluciones decrecientes de una cepa patógena de *Leptospira* (serogrupo Autumnalis) y otras especies de bacterias

Diluciones de ADN de <i>L. interrogans</i> Autumnalis y ADN de controles negativos	Ct
10 ⁷	16.49
10 ⁶	20.34
10 ⁵	23.21
10 ⁴	26.26
10 ³	28.62
10 ²	29.97
10 ¹	32.55
10 ⁰	34.05
<i>L. biflexa</i> Semarang	34.03
<i>Staphylococcus aureus</i>	34.09
<i>Enterococcus faecalis</i>	34.11
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	34.13
<i>Pasteurella multocida</i>	34.37
<i>Escherichia coli</i>	34.40

LITERATURA CITADA

- Acha PN, Szyfres B. 2003.** Leptospirosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I. Bacteriosis y Micosis. 3^a ed. Publicación Científica y Técnica No. 580. Washington, EEUU: Organización Panamericana de la Salud. p 175-186.
- Adler B, De la Peña Moctezuma A. 2010.** *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-297. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. 2009.** Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 4(9): e7093. doi: 10.1371/journal.pone.0007093
- Blum S, Chi M, Maldonado M, Nuñez L, Gómez M, Caballero R, Tamay P. 2013.** Detection of reactive canines to *Leptospira* in Campeche City, Mexico. *Rev Argent Microbiol* 45: 34-38.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, et al. 1995.** Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 43: 110-114.
- Céspedes M. 2005.** Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 22: 290-307.
- Espy M, Uhl JR, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, et al. 2006.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19: 165-256. doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
- Cole J, Sulzer C, Pursell A. 1973.** Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 25: 976-980.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999.** *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd ed. Melbourne. MediSci. 272 p.
- Fonseca D, Gutiérrez A, Mateus H, Silva C, Contreras N, Giraldo A. 2005.** Análisis de muestras de orina para la detección molecular de enfermedades infecciosas. Aplicación en la identificación de citomegalovirus humano. *Rev Ciencias Salud* 3: 136-147.
- Haake DA, Matsunaga J. 2005.** Leptospiral membrane proteins - variations on a theme? *Indian J Med Res* 121: 143-145.
- Hartskeerl R, Collares-Pereira M, Ellis W. 2001.** Emergence, control and reemerging leptospirosis; dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x

13. **Hartskeel RA. 2005.** International Leptospirosis Society. Objectives and achievements. *Rev Cub Med Trop* 57: 7-10.
14. **Levett PN. 2001.** Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
15. **Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. 2005.** Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45-49.
16. **Louvel H, Picardeau M. 2007.** Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. *Curr Protoc Microbiol* 12: 12-14. doi: 10.1002/9780471729259.mc12e04s05
17. **McBride A, Athanazio D, Reis M, Ko A. 2005.** Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376-386.
18. **Mendes V, Simoes M, Barbosa A, Navagantes W. 2011.** Years of potencial life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. *Rev Saúde Pública* 45: 1001-1008.
19. **Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30: 2219-2224.
20. **Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. 2005.** A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139-147. doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.011
21. **Musso D, La Scola B. 2013.** Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *J Microbiol Immunol Infect* 46: 245-252. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001>
22. **Navarrete J, Acevedo J, Huerta E, Torres J, Gavaldón D. 2006.** Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. *Sal Pub Mex* 48: 220-228.
23. **[OIE] World Organisation for Animal Health. 2014.** Leptospirosis. Ch 2.1.9. OIE Terrestrial Manual 2014. [Internet]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf
24. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2008.** Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 127 p.
25. **Palaniappan R, Chang Y, Chang C, Pan M, Yang C, Harpending P, McDonough S, et al. 2005.** Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes* 19: 111-117. doi: 10.1016/j.mcp.2004.10.002
26. **Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. 2001.** First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 40: 189-199.
27. **Roczek A, Forster C, Raschel H, Hormansdorfer S, Bogner KH, Hafner-Marx A, Lepper H, et al. 2008.** Severe course of rat bite associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. *J Med Microbiol* 57: 658-663. doi: 10.1099/jmm.0.47677-0
28. **Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller I, Markey B, Nally J. 2010.** Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1305-1309. doi: 10.1007/s10096-010-0991-2
29. **Romero M, Sánchez V. 2009.** Seroprevalencia de Leptospirosis canina de tres municipios del departamento del Tolima-Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 14: 1684-1689.
30. **Serrano M. 2012.** Exposición a *Leptospira* spp patógena del elefante marino, *Mirounga angustirostris*. Tesis de Maestría. México: Universidad Autónoma de Baja California. 134 p.
31. **Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. 2007.** Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp against culture and *Leptospira* specific

- IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 361-366. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.004
32. **Smythe L, Smith I, Smith G, Dohnt M, Symonds M, Barnett L, McKay D. 2002.** A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* 2: 13-20. doi: 10.1186/1471-2334-2-13
33. **Stoddard R, Gee J, Wilkins P, McCaustland K, Hoffmaster A. 2009.** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247-255. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
34. **Vargas E. 2014.** Situación de la leptospirosis en el Perú, años 2013-2014 (a la SE 19). *Bol Epidemiol (Lima)* 23(19): 382-385.
35. **Verkooyen R, Luijendijk W, Huisman W, Goessesns J. 1996.** Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the AMPLICOR *Chlamydia tracho-matis* assay. *J Clin Microbiol* 34: 3072-3074.
36. **Villumsen S, Pedersen R, Krogfelt K, Jensen J. 2010.** Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: improved method for DNA extraction from blood cultures. *PLoS One* 5(8):e12095. doi: 10.1371/journal.pone.0012095
37. **Wang C, Freeman M, Kaltenboeck B. 2012.** *Veterinary PCR diagnostics*. USA: Bentham Ebooks. 137 p.
38. **[WHO] World Health Organization International. 2003.** *Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta: WHO. 109 p.