

Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria

Diagnosis of leptospirosis by molecular techniques: advantages and limitations in veterinary medicine

Martin PL^{1*}, Arauz MS¹, Stanchi NO^{1,2}

¹Laboratorio de leptospirosis. Hospital escuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata ²Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Cuyo
*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: mpaulalorena@gmail.com

Resumen: La leptospirosis constituye una zoonosis emergente de distribución mundial causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. La enfermedad reviste gran importancia tanto a nivel económico como en la salud pública. El diagnóstico de la leptospirosis es complejo y generalmente se realiza por métodos bacteriológicos y serológicos. En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido el diagnóstico de muchas enfermedades de etiología microbiana, incluida la leptospirosis. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los protocolos de PCR publicados en medicina veterinaria para resaltar las ventajas y desventajas de esta técnica aplicada al diagnóstico clínico y a estudios epidemiológicos. Aunque, la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil de los métodos de referencia, son necesarios estudios adicionales en relación a la utilización de la misma para el diagnóstico de la enfermedad en animales. Concluimos que al interpretar los resultados obtenidos con la técnica de PCR se debe considerar: incluir un control interno de amplificación en cada protocolo y optar por técnicas de PCR anidada o en tiempo real debido a su mayor sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: PCR, *Leptospira*, diagnóstico veterinario

Abstract: Leptospirosis is an emerging worldwide zoonosis caused by pathogenic spirochaetes of the genus *Leptospira*. The disease is of great importance both economically and for the public health. The diagnosis of leptospirosis is complex and usually done by bacteriological and serological methods. In recent decades, the application of molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR) has achieved the diagnosis of many diseases of microbial etiology, including leptospirosis. The aim of this study was to review PCR protocols published in veterinary medicine to highlight the advantages and disadvantages of this applied technique to clinical diagnosis and epidemiological studies. Although the application of PCR proved to be a useful complement to the referenced methods, additional studies are needed regarding the use of it for the diagnosis of disease in animals. We conclude that the interpretation of the results obtained with the PCR technique must include an internal amplification control for each protocol and must choose nested PCR techniques or real time, due to its higher sensitivity and specificity.

Key Words: PCR, *Leptospira*, veterinary diagnostic

Introducción

La leptospirosis constituye una zoonosis de distribución mundial causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. Actualmente es considerada una enfermedad infecciosa emergente debido a los brotes epidémicos que ocasiona, en su mayoría asociados a desastres naturales tales como inundaciones (Alemayehu 2012; Cruz *et al* 2009; Levett 2001). La principal fuente de infección la constituyen los animales domésticos y silvestres, quienes actúan como reservorios debido a que mantienen a la *Leptospira* spp. principalmente en riñón, contaminando por intermedio de la orina el medio ambiente (Bengis *et al* 2004).

En animales de producción, las pérdidas económicas que ocasiona están vinculadas a alteraciones reproductivas, muertes perinatales y disminución de la producción láctea (Draghi *et al* 2010; Gyles 2008). En el ser humano, la leptospirosis produce desde una enfermedad leve hasta cuadros que comprometen la vida como la neumonía hemorrágica o la forma icterohemorrágica conocida como enfermedad de Weil (Helmerhorst *et al* 2012; Krishnappa *et al* 2012; Li Cavoli *et al* 2012; Seijo *et al* 2002).

A pesar de su relevancia en la salud humana y en la economía del país, la leptospirosis se encuentra entre las enfermedades zoonóticas subdiagnosticadas. Las explicaciones a este hecho se basan posiblemente en su forma de presentación clínica y la metodología disponible para el diagnóstico. En cuanto a su presentación clínica, la enfermedad tanto en humanos como en animales tiene un amplio rango de signos clínicos sin embargo, ninguno es patognomónico siendo confundidos con los de otras enfermedades infecciosas. Acrecentando aún más la complejidad, la existencia de una forma subclínica de la enfermedad en muchas especies de animales, los convierte en eliminadores de *Leptospira* spp. favoreciendo su diseminación al medio ambiente (Adler *and de la Pena Moctezuma* 2010). Por otro lado en el diagnóstico, los métodos estándares son laboriosos y requieren personal bien entrenado, por lo que se realiza sólo en laboratorios especializados. El test de microaglutinación (MAT) considerado la técnica *gold standard* tanto en humanos como en animales constituye un método altamente específico sin embargo, presenta importantes limitaciones principalmente en la fase aguda de la enfermedad dada la ausencia de anticuerpos detectables en suero. Asimismo, la interpretación de los resultados requiere de muestras pareadas con un intervalo de 15 a 21 días para observar seroconversión (suero agudo y convaleciente) y así obtener un resultado confirmatorio (Barthi *et al* 2003; WHO 2003). El diagnóstico mediante el aislamiento del microorganismo no resulta útil desde el punto de vista clínico debido a que requiere varias semanas

para su confirmación y es frecuente la contaminación con otros microorganismos (Levett 2001).

En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido mejorar el diagnóstico de leptospirosis. Hasta la fecha se han publicados numerosos protocolos de PCR punto final y en tiempo real para detección y/o cuantificación de *Leptospira* spp. en diversas muestras tanto clínicas como ambientales (Agampodi *et al* 2012; Aghaiypour *and Safavieh* 2007; de Abreu Fonseca *et al* 2006; Natarajaseenivasan *et al* 2012; Vein *et al* 2012; Yasouri *and Ghane* 2014). Sin embargo, pocos han sido sometidos a un riguroso protocolo de validación para su aplicación confiable en el diagnóstico de leptospirosis humana (Brown *et al* 1995; Gravekamp *et al* 1993; Merien *et al* 1992) siendo aún más escasos los protocolos validados para veterinaria.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los diferentes protocolos de la técnica de PCR publicados en medicina veterinaria, con el fin de conocer su utilidad y las principales limitaciones de esta técnica aplicada al diagnóstico clínico y a estudios epidemiológicos.

Generalidades de la técnica de PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa constituye una reacción enzimática que permite obtener un gran número de copias de una secuencia determinada a partir de un segmento específico de ADN. Todas las variaciones de la técnica (punto final y en tiempo real) comparten el mismo fundamento, sin embargo la principal diferencia se basa en el tiempo o fase en la cual se recolectan los datos. Así, en la PCR punto final la detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio al final del proceso de amplificación (Wilson 2005). Mientras que, en la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en la fase exponencial, la lectura en este caso es realizada mediante la utilización de agentes intercalantes o sondas marcadas con fluoróforos. Esto permite medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, debido a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (Gibson 2006).

La técnica de PCR se caracteriza por ser un método de diagnóstico altamente sensible y específico. En los protocolos de PCR punto final, la sensibilidad se halla entre valores de 100 a 1.000 copias del genoma del microorganismo en estudio; mientras que la especificidad analítica alcanza valores aceptables dependiendo del diseño de los cebadores entre otros

factores. Tanto la sensibilidad como la especificidad pueden mejorarse mediante la aplicación de lo que se conoce como PCR anidada o nested-PCR, así como mediante la comprobación de los productos amplificados por hibridación con sondas marcadas. Sin embargo, esto conlleva tiempo adicional e inconvenientes de contaminación con falsos positivos. Por ese motivo no se aplica rutinariamente en los laboratorios de diagnóstico. En los ensayos de PCR anidada se utilizan dos ciclos de amplificación con cuatro cebadores, denominados cebadores externos e internos. Esto permite por un lado, aumentar la sensibilidad a 10 copias de genoma del microorganismo en estudio y por otro, incrementar la especificidad debido a que cuatro oligonucleótidos deben unirse específicamente a las secuencias seleccionadas para producir una reacción positiva (OIE 2008). Por su parte, en la PCR en tiempo real la sensibilidad es igual o superior a la de una PCR anidada, pero con un riesgo de contaminación menor debido a que la fluorescencia es medida a través del recipiente de reacción, de forma que no es necesario el manejo posterior de los productos amplificados (Kubista *et al* 2006).

Dos aspectos importantes a tener en cuenta en la utilización de las variantes de la técnica de PCR constituyen los controles utilizados y el proceso de validación seguido. Toda técnica de PCR debe incluir un control de sistema, es decir la mezcla de reacción de PCR sin ADN del microorganismo en estudio y uno o más controles externos positivos y negativos. Estos últimos son segmentos de ADN conocidos, que se analizan en tubos independientes del ADN problema. Además, la utilización cada vez más frecuente de un control interno de amplificación incluido en cada uno de los tubos de PCR con el ADN problema permite identificar resultados falsos negativos causados por inhibidores de la PCR o errores en el proceso de extracción. Por lo tanto, si una muestra diera negativa al gen buscado pero existiera amplificación del control interno se puede concluir que el *target* buscado está ausente o por debajo del límite de detección de la técnica (Hoorfar *et al* 2004).

Con referencia al proceso de validación existen numerosos protocolos a seguir, pero es importante remarcar algunos conceptos o definiciones que usualmente se utilizan de manera incorrecta. La sensibilidad analítica se refiere al número de copias mínimo en una muestra que puede ser adecuadamente medido con un ensayo; mientras que la sensibilidad clínica es el porcentaje de individuos con un desorden dado a quienes el ensayo identifica como positivos para esa condición. El límite de detección (LOD) es la concentración que puede ser detectada con certeza en un procedimiento analítico dado (95 % de probabilidad). La especificidad analítica se refiere a la detección de la

secuencia específica que se desea analizar; mientras que la especificidad diagnóstica es el porcentaje de individuos sin una condición dada a quienes el ensayo identifica como negativos para esa condición (Bustin *et al* 2009).

Principales diferencias en las técnicas moleculares para la detección de *Leptospira* spp.

Hasta la fecha varios protocolos de PCR punto final y en tiempo real han sido publicados para el diagnóstico de leptospirosis en las distintas especies animales. Las diferencias entre ellos radican fundamentalmente en los cebadores y muestras clínicas utilizadas como también, en los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos.

Cebadores

Con respecto a los cebadores, Van Eys *et al* (1989) utilizaron secuencias desarrolladas a partir de librerías genómicas para detectar específicamente *Leptospira* spp. pertenecientes al serovar Hardjo-Bovis en muestras de orina de bovinos, mientras que otros autores utilizaron elementos repetitivos presentes en el genoma de *Leptospira* spp. serovar Hardjo-Bovis con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica (Woodward and Sullivan 1991). Por otra parte, Zuerner *et al* (1995) desarrollaron un método basado en la técnica de PCR con cebadores diseñados a partir de secuencias de inserción (IS 1533) presentes en el genoma de *Leptospira interrogans sensu lato*, que permite la identificación de serovares mediante el análisis directo de la orina de los animales infectados.

Asimismo, los cebadores han sido desarrollados a partir de genes definidos. En este contexto, hay ensayos basados en la detección de secuencias específicas de genes tales como *rrs* que codifica para la subunidad ribosomal 16S (Doosti *et al* 2012; Merien *et al* 1992; Rodriguez *et al* 2001), *rrl* codifica para la subunidad ribosomal 23S (Woo *et al* 1997; Rodriguez *et al* 2001) *gyrB*, gen que codifica la subunidad B de la enzima ADN girasa (Slack *et al* 2006), y *secY* codificante para una proteína translocasa (Ahmed *et al* 2009; Victoria *et al* 2008). Además existen ensayos basados en la detección de genes presentes sólo en especies patógenas del Género *Leptospira* (OIE 2014), por ejemplo *lipL21* (Cheemaa *et al* 2007), *lipL32* (Azizi *et al* 2012; Bomfim *et al* 2008; Garcia Monte *et al* 2012; Levett *et al* 2005), *lipL41* (Balassiano *et al* 2012), *ligA* y *ligB* (Palaniappan *et al* 2005; Xu *et al* 2014)

A partir del gen *rrs* se han desarrollado cebadores que detectan todas las especies del género *Leptospira* (patógenas, intermedias y no patógenas).

Tabla 1. Cebadores, muestra, sensibilidad, especificidad y técnicas de PCR utilizadas para el diagnóstico de la leptospirosis por diferentes autores.

Cebadores utilizados	Tipo de muestra	Sensibilidad	Especificidad	Técnica de PCR	Referencia
Secuencia del clon pLBec23s derivado de una librería genómica de <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo, tipo Hardjo-Bovis, cepa HB013.	Orina de bovinos	10-20 <i>Leptospira</i> por reacción. Muestras de orina y medio añadidas.	No observó amplificación con otros serogrupos, bacterias (n=10) ni ADN de eucariotas	Punto final	Van Eys <i>et al</i> 1989
Elemento repetitivo del genoma de <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo tipo Hardjo-Bovis	Cepas puras	Sin datos	30 aislamientos de Hardjo-Bovis fueron positivos. 12 aislamientos de Hardjoprajitno y Saxkoebing fueron negativos	Punto final	Woodward and Sullivan 1991
Secuencia de Inserción 1533	Orina de bovinos	Sin datos	Sin datos	Punto final	Zuerner <i>et al</i> 1995
Gen rrs de la subunidad ribosomal 16S	Cultivo, LCR, orina y sangre con agregado de cepas puras. Orina de ratones infectados experimentalmente. Orina, LCR y sangre de humanos	Límite más bajo de detección fue 1 pg de ADN. Sensibilidad analítica 10 ² microorganismos.	20 serotipos de <i>Leptospira</i> fueron positivos. Otras bacterias fueron negativas (n=13)	Punto final	Merien <i>et al</i> 1992
Gen rrl, rrs y hap1	Orina de bovinos	100 % S. clínica comparada con el cultivo	99 % E. clínica comparada con el cultivo	Punto final	Rodríguez <i>et al</i> 2001 (según León <i>et al</i> 2006)
Gen rrs de la subunidad ribosomal 16 S	Muestras de sangre de camélidos.	Sin datos	Sin datos	Punto final	Doosti <i>et al</i> 2012
Gen rrs de la subunidad ribosomal 16 S	Cepas puras. Muestras de sangre y orina de humanos	S. analítica: dos células en suero y 10 células en orina.	E. analítica: Resultado positivo con 29 cepas de <i>Leptospira</i> y negativo con 22 de otros organismos	Tiempo real con sonda TaqMan	Smythe <i>et al</i> 2002
Gen gyrB codificante de la subunidad B de la enzima ADN girasa	Suero y sangre con EDTA de pacientes humanos	S. analítica 10 copias del genoma por reacción. S clínica 96,4 %	E. clínica 99,5 %	Tiempo real con sonda TaqMan	Slack <i>et al</i> 2006
Gen secY	Cepas puras, suero, sangre con anticoagulante y tejidos de pacientes humanos.	S. analítica: 1-1,5 copias de genoma una copia por reacción para cultivos. De 10-50 copias para muestras de sangre, suero y tejido renal.	E. analítica: todas las especies patógenas del género dieron un resultado positivo. No observaron reacción cruzada con especies saprófitas ni con otros géneros bacterianos	Tiempo real con química SYBR green	Ahmed <i>et al</i> 2009
Gen lipL32	Cepas puras. Sangre y orina de pacientes humanos.	S. analítica 3 copias en sangre 10 en orina	Sin datos	Tiempo real con SYBR green	Levett <i>et al</i> 2005

L. Martín y col.

Gen lipL32	Cepas puras. Sangre con anticoagulante, suero, plasma y orina de pacientes humanos.	S. analítica: 1×10^1 <i>Leptospira</i> spp/ml de sangre; 1×10^3 <i>Leptospira</i> spp /ml de suero; 1×10^2 <i>Leptospira</i> spp /ml	E. analítica 100 %	Tiempo real con sonda TaqMan	Stoddard <i>et al.</i> 2009
Gen ligA ligB		S. analítica 6 <i>Leptospira</i> spp/ml con PCR punto final y 10 genomas / reacción con PCR tiempo real	E. analítica se observó amplificación con todos los serovares de <i>Leptospira</i> spp. No se observó amplificación con serovares de especies no patógenas ni con otros géneros	Punto final y tiempo real con sonda TaqMan	Palaniappan <i>et al</i> 2005
Gen lig	Sangre y orina de caninos	20 copias del gen <i>lig</i> / ml sangre y 10 copias/ 3-4 ml de orina	100 %	Tiempo real con sondas FRET	Xu <i>et al</i> (2014)
G1-G2 (Secuencia del plásmido recombinante pLIPs60) B64I- B64II (Secuencia del plásmido recombinante pBIM64)	Cepas puras, muestras de suero humano	1-10 <i>Leptospira</i> spp/ml de suero con agregado artificial de <i>Leptospira</i> . La PCR (50 %) más sensible que el cultivo (35 %).	Utilizando ambos cebadores amplificaron todas las especies patógenas.	Punto final	Gravekamp <i>et al</i> 1994

Ref. S. sensibilidad E. Especificidad.

La principal ventaja de su utilización es la mayor sensibilidad analítica debido a que presenta doble número de copias en el cromosoma de las especies de *Leptospira* (Nascimento *et al* 2004). Además puede facilitar la identificación de especies y/o cepas no descritas previamente y aquellas en las que todavía no se ha podido demostrar su condición de patógenas como el caso de las especies intermedias (Thaipadunpanit *et al* 2011; Zakeri *et al* 2010). Sin embargo, una importante limitación de este *target* es que al ser un gen conservado en el reino Bacteria puede amplificar segmentos de ADN de microorganismos no relacionados con *Leptospira* spp. disminuyendo de esta manera la especificidad analítica de la técnica (Villumsen *et al* 2012).

Otros autores como Smythe *et al* (2002) y Fearnley *et al* (2008), utilizaron cebadores dirigidos a una región conservada de la secuencia del gen *rrs* (16S ARNr) de especies patógenas de *Leptospira* spp. lo que permitió discriminar entre especies patógenas y saprófitas.

Por su parte, la utilización de cebadores dirigidos a genes presentes sólo en especies patógenas, proporciona un diagnóstico altamente específico debido a que al ser regiones conservadas entre las especies patógenas del género *Leptospira* no presentan el inconveniente de amplificar secuencias semejantes en otros microorganismos. La principal limitación del uso de estos *targets* recae en que no detectan especies intermedias tales como *L. wolffii*, *L.*

licerasiae, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. broomii* de las cuales aún no se conoce su rol en la enfermedad humana o animal (Balamurugan *et al* 2013; Levett *et al* 2006;). Entre los genes más utilizados para el diseño de los cebadores se encuentran determinadas secuencias de genes que codifican para proteínas tales como: *lipL32* que codifica para una lipoproteína de membrana externa (Haake *et al* 2000); *ligA-ligB* que codifican para proteínas implicadas en la virulencia de cepas patógenas (Choy *et al* 2007; Palaniappan *et al* 2002) y *flaB* codificante para una proteína flagelar (Kawabata *et al* 2001; Michinos *et al* 1991; Picardeu *et al* 2001).

De la misma forma, existen ensayos específicos de especies patógenas que utilizan dos pares de cebadores (G1/G2 y B64-I/B64-II) abarcando todas las especies clasificadas dentro de esta categoría validados para medicina humana y posteriormente aplicados al diagnóstico veterinario (Cai *et al* 2002; Gravekamp *et al* 1993; Jafari *et al* 2011; Meira *et al* 2011; Talpada *et al* 2003; Rodriguez *et al* 2014).

Muestras clínicas

Para la detección de *Leptospira* spp. en animales generalmente se utilizan muestras de sangre con anticoagulante, plasma, suero, orina, semen, humor acuoso, productos del aborto y órganos tales como riñón e hígado (Faber *et al* 2000; Fearnley *et al* 2008; Van Eys *et al* 1989). La elección de una de ellas dependerá de la especie animal, del objetivo del estudio (diagnóstico precoz o búsqueda de especies

portadoras) y del momento de la toma de muestra (leptospiemia vs leptospiuria) (OIE 2008).

A fin de comparar la eficacia de cada una de ellas en la detección de *Leptospira* spp. por PCR, se han realizado estudios que evalúan el efecto de la matriz sobre la eficiencia de la PCR y el límite de detección. Para ello, utilizan muestras provenientes de individuos sanos a las que experimentalmente se les adiciona un número determinado de *Leptospira* spp. por mililitro. En veterinaria hay escasos datos publicados por lo que se mencionarán los ensayos más relevantes en medicina humana a fin de tomar como referencia los resultados para la detección de *Leptospira* spp. en las especies animales.

La sangre con anticoagulante, el suero y el plasma constituyen las muestras de elección en la primera fase de la enfermedad cuando la *Leptospira* spp. presenta alta concentración en sangre. En el caso de la sangre con anticoagulante la presencia de inhibidores puede afectar la eficiencia de la técnica de PCR (Wilson 1997). Sin embargo, este hecho es fácilmente eludido con los nuevos métodos de extracción y purificación basados en columnas de sílice (QIAGEN, Australia; Roche Applied Science) que permiten obtener cantidades de ADN de excelente calidad.

En un estudio realizado por Levett *et al* (2005) se demostró que el ADN de *Leptospira* spp. pudo ser detectado en muestras de sangre con EDTA o citrato como anticoagulante hasta 5 días después de la contaminación artificial, con una sensibilidad analítica de 3 equivalentes genomas por reacción; mientras que la utilización de heparina de litio o sodio como anticoagulante resultó inhibitoria. En forma similar, Stoddard *et al* (2009) utilizando sangre con anticoagulante EDTA obtuvo una sensibilidad de 10 *Leptospira* spp /ml.

Cuando la PCR se realizó a partir de muestras de suero reveló resultados de eficiencia discrepantes. Para algunos autores (Bouhry *et al* 2011, Stoddard *et al* 2009) mostró ser menos eficiente con valores de sensibilidad analítica de 1×10^3 *Leptospira* spp. /ml; mientras que para otros (Gonzales *et al* 2013) tuvo una sensibilidad de 10^2 bacterias/ml, similar al valor hallado con muestras extraídas con anticoagulante EDTA. Cabe destacar, que en el caso de la publicación de Stoddard *et al* (2009) la contaminación artificial se realizó antes que la sangre coagulara y por lo tanto las bacterias pudieron haber quedado retenidas en el coágulo, razón por la cual obtuvieron una menor sensibilidad. En otros trabajos realizados para el diagnóstico de leptospirosis humana a partir de muestras de suero mediante una técnica de PCR anidada con límites de detección de 1 a 2 pg hasta 10 fg de ADN, los autores pudieron detectar una bacteria por reacción (Blanco and Romero 2014; Djadid *et al* 2009).

Las muestras de orina en caninos y humanos cuyo pH normalmente es ácido representan un desafío para la detección molecular de *Leptospira* spp. Luchessi *et al* (2004) utilizando una técnica de PCR punto final obtuvieron resultados negativos al exponer muestras a orina ácida durante 90 minutos y conservadas a -20 °C sin tratamiento antes de su procesamiento. Los autores describieron una serie de recomendaciones como neutralizar la orina, concentrar las *Leptospira* spp. por centrifugación, lavado del *pellet*, etc. a fin de evitar la degradación del ADN luego del congelado. Por su parte, Levett *et al* (2005) pudieron detectar ADN de *Leptospira* spp. luego de mantener la muestra de orina hasta 16 días a temperatura ambiente en recipientes protectores de ADN/ARN (Sierra Diagnostics®). En cuanto a la sensibilidad analítica hallada con técnicas de PCR convencional existen valores de 1×10^4 *Leptospira* spp. /ml de orina; mientras que con la utilización de técnicas de PCR en tiempo real la sensibilidad aumenta a 1×10^2 *Leptospira* spp. /ml (Lucchesi *et al* 2004; Stoddard *et al* 2009).

Las muestras obtenidas *post mórtem* y procesadas para estudios histopatológicos constituyen un material imprescindible en aquellos pacientes que fallecen antes de la confirmación del diagnóstico o en la realización de estudios epidemiológicos retrospectivos. En este contexto cabe destacar el trabajo publicado por Noda *et al* (2014) en humanos, en este estudio diseñaron y validaron una técnica de PCR punto final con cebadores dirigidos al gen *lipL32* a partir de órganos embebidos en parafina. Además incorporaron un control interno de amplificación y confirmaron mediante secuenciación los resultados positivos.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Finalmente, al evaluar la utilidad de la técnica de PCR frente a las técnicas tradicionales de diagnóstico como serología o cultivo bacteriológico los resultados de sensibilidad y especificidad diagnóstica son ambiguos. Merien *et al* (2005) demostraron la utilidad de una técnica de PCR en tiempo real y una PCR anidada con la detección de *Leptospira* spp. en suero de 9 pacientes humanos de un total de 51 personas incluidas en el estudio que posteriormente mostraron seroconversión en el segundo muestreo mediante la técnica de MAT. Asimismo, en este estudio se observaron 16 muestras positivas por la técnica de PCR pero desafortunadamente no se pudo obtener una segunda muestra de suero para demostrar seroconversión.

Cuando la técnica de PCR fue comparada con el cultivo como técnica de referencia Boonsilp *et al* (2011) demostraron que sólo el 9 % de un total de 418 pacientes humanos fueron positivos por el cultivo,

mientras que el 19 % fueron negativos para el cultivo pero positivos con la técnica de PCR.

En caninos, Harkin *et al* (2003a) evaluaron una técnica de PCR punto final dirigida al gen que codifica para la subunidad ribosomal 23S a partir de muestras de orina para el diagnóstico de leptospirosis. El 6 % de 132 animales resultaron positivos con los criterios de diagnóstico establecidos (seroconversión en muestras pareadas) y fueron también positivos por PCR, obteniendo de esta manera valores de sensibilidad y especificidad de 100 % y 88,3 % respectivamente. Asimismo, un canino resultó positivo con la técnica de PCR antes de mostrar seroconversión.

Al evaluar la utilidad de la PCR en la detección de caninos portadores y excretores de *Leptospira* spp. en orina, nuevamente Harkin *et al* (2003b) compararon la técnica de PCR contra el cultivo bacteriológico y test serológico. En su estudio el 8,2 % de 500 animales fueron positivos mediante la técnica de PCR y de estos el 1,8 % mostró serología positiva con títulos de anticuerpos en el Test de MAT iguales o mayores a 1:100.

Contrariamente a los hallazgos mencionados, en un estudio realizado por Fraune *et al* (2013) con muestras de orina de caninos la técnica de PCR no logró detectar ningún caso positivo a pesar de haber logrado la confirmación serológica de la enfermedad.

Diferentes protocolos utilizados en PCR punto final en animales

Entre los protocolos que utilizan regiones del gen *rrs* para la detección molecular de *Leptospira* spp. publicados hasta la fecha, el trabajo realizado por Merien *et al* (1992) en medicina humana ha sido el más evaluado para el diagnóstico en varias especies de animales con diferentes muestras clínicas. Así, en bovinos Richtzenhain *et al* (2002) realizaron una PCR punto final múltiple para la detección de *Brucella* y *Leptospira* a partir de fetos abortados. Con respecto a *Leptospira* spp, los autores obtuvieron resultados positivos con la técnica de PCR en tres muestras que dieron negativas por aislamiento. Posteriormente Magajevsky *et al* (2005) aplicaron la técnica de PCR con el mismo protocolo de Merien, en muestras de orina y semen de toros utilizando aislamiento, inoculación en animales de experimentación y serología como método de confirmación. En su estudio, todas las muestras de semen fueron negativas mediante la técnica de PCR y sólo una muestra de orina fue positiva por PCR y por cultivo. Por su parte, en caprinos y ovinos, Lilenbaum *et al* (2008) evaluaron la utilidad de la técnica de PCR para la detección de *Leptospira* spp. en semen y fluido vaginal proveniente de animales serorreactivos con títulos mayores a 400 mediante el Test de Microaglutinación. En su estudio pudieron

demostrar la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en 6 muestras de semen y 7 de fluido vaginal en las cuales en el cultivo había sido negativo, demostrando una mayor sensibilidad de la técnica de PCR. En primates no humanos Scarcelli *et al* (2003) utilizaron la técnica de PCR para el diagnóstico en un mono capuchino (*Cebus apella*) muerto con características compatibles con leptospirosis en el examen *post mortem* (ictericia, riñones hemorrágicos y friables) comparándola con el aislamiento y la inoculación en animales de experimentación. En su estudio, tanto el cultivo como la inoculación experimental dieron resultados negativos y el único método de confirmación fue el resultado positivo de la técnica de PCR. Por su parte, en porcinos Soto *et al* (2006) evaluaron la técnica de PCR a partir de muestras de cerdas inoculadas experimentalmente (orina, riñón e hígado) y lechones nacidos de las madres infectadas (riñón, hígado, corazón, bazo, pulmón y contenido gástrico). Con respecto a las cerdas (n=6), todas mostraron anticuerpos luego de la infección, pero el cultivo y la PCR de orina dieron negativos; solo una muestra de riñón e hígado dio resultado positivo por PCR. Mientras que en los lechones (n=12) 10 mostraron resultados positivos por PCR en al menos una muestra.

En bovinos Bomfin *et al* (2008) utilizaron una técnica de PCR anidada para detectar *Leptospira* spp. en orina de animales con sospecha de la enfermedad. De un total de 30 muestras de orina analizadas, 10 resultaron positivas mediante el cultivo y la técnica de PCR anidada; mientras que 16 de las 20 muestras restantes fueron positivas sólo por la técnica de PCR. Posteriormente, Azizi *et al* (2012) evaluaron la correlación entre lesiones macroscópicas en riñones de animales de matadero con diagnóstico presuntivo de leptospirosis mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores dirigidos al gen *lipL32* descritos por Tansuphasi *et al* (2006). En su estudio, los autores pudieron detectar ADN de *Leptospira* spp. en 19 de 24 riñones con lesiones macroscópicas conocidas como manchas blancas compatibles con leptospirosis, conjuntamente con diagnóstico histopatológico de nefritis intersticial. Cabe destacar que si bien tanto las lesiones macroscópicas como microscópicas halladas son frecuentes en animales con leptospirosis, no son patognomónicas de dicha enfermedad debido a que pueden presentarse en enfermedades como colibacilosis septicémica, salmonelosis, brucelosis o fiebre catarral maligna (Barker 1993; Maxie 1993; McGavin and Zachary 2007).

Utilizando también cebadores dirigidos al gen *lipL32*, Garcia Monte *et al* (2012) desarrollaron un método de PCR y separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales a fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica, para el diag-

nóstico de leptospirosis en caninos. Cabe destacar de su estudio la incorporación de un Control Interno de Amplificación a fin de identificar resultados falsos negativos.

En equinos, Pinna *et al* (2011) demostraron la utilidad de la técnica de PCR con el protocolo descrito por Stoddard *et al* (2009) para el diagnóstico de leptospirosis en hembras con signología de aborto, donde el cultivo fue en todos los casos negativos. Asimismo, utilizando los cebadores descritos por Stoddard *et al* (2009), Hamond *et al* (2013) demostraron la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en muestras de semen y orina de equinos serológicamente reactivos pero sin signología de la enfermedad; cabe destacar de su estudio, que también incorporó un Control Interno de Amplificación en su protocolo.

Diferentes protocolos utilizados en PCR en tiempo real en animales

En los últimos años, el protocolo de Merien *et al* (1992) fue evaluado mediante una técnica de PCR en tiempo real utilizando química SYBR Green. En el campo de investigación, Lourdault *et al* (2009) evaluaron la carga bacteriana en sangre y órganos (riñón, hígado, bazo, etc.) empleando un modelo de infección en cobayos. Mientras que, Fornazari *et al* (2012) compararon una PCR punto final, con una PCR cuantitativa en tiempo real, cultivo bacteriológico y la técnica de Warthin Starry para el diagnóstico de *Leptospira* spp en muestras de sangre y órganos (riñón e hígado) de ovinos y caprinos serológicamente reactivos; demostrando que la PCR cuantitativa en tiempo real fue el método más sensible para el diagnóstico.

Los cebadores dirigidos al gen *lipL* 32 fueron evaluados por diferentes autores en la especie canina, bovina y equina. En caninos, Rojas *et al* (2010) estudiaron muestras de orina remitidas para análisis completo demostrando un 6,8 - 11,1 % de positividad y un promedio de equivalentes genomas (número de copias) eliminados por orina de $6,2 - 2,3 \times 10^4$ por ml. En el campo de la investigación la aplicación de técnicas de PCR cuantitativas resultan útiles para evaluar la interacción de *Leptospira* spp. con el hospedador. Así Chagas Junior *et al* (2012) utilizaron el protocolo publicado por Rojas *et al* (2010) para detectar y cuantificar *Leptospira* spp. en riñón de ratas y hámsteres infectados experimentalmente en comparación con un método de impronta inmunofluorescente y aislamiento; demostrando la utilidad de la qPCR para determinar el número de *Leptospira* spp. por gramo de tejido.

En el año 2014 nuestro grupo de investigación ha trabajado en la estandarización de una técnica de PCR en tiempo real con cebadores dirigidos a un fragmento del gen *lipL*32 que incluye un control interno

no competitivo para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de suero y orina de caninos. En los resultados preliminares hemos obtenido una sensibilidad 1×10^2 y 1×10^0 *Leptospira*/ ml respectivamente (datos del trabajo de Tesis no publicados).

Otros de los genes utilizados como *targets* para la detección de *Leptospira* spp. mediante PCR como *secY* también fueron ensayados. Ahmed *et al* (2012), evaluaron una PCR en tiempo real con química SYBR Green previamente validada en humanos (Ahmed *et al* 2009) para el seguimiento de una infección experimental utilizando el aislamiento como método de referencia. En su estudio pudieron demostrar la utilidad de la PCR para el diagnóstico temprano de la enfermedad en caninos con una sensibilidad y especificidad de la PCR de 88,9 % y 89,3 % respectivamente.

Finalmente, han sido utilizadas secuencias de los genes *ligA/B* para la detección de *Leptospira* spp. en muestras clínicas y en la discriminación de especies dentro del género. Palaniappan *et al* (2005) desarrollaron una PCR en tiempo real utilizando cebadores dirigidos a secuencias de los genes *lig*. En su estudio, evaluaron la eficacia de la técnica en comparación con el cultivo para la detección de *Leptospira* spp. en hámsteres inoculados artificialmente con la cepa *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Los autores demostraron que fue 100 % específica para la detección de cepas patógenas con un rango de detección de 10^1 a 10^7 de ADN cromosómico de *Leptospira* spp.

Recientemente, han sido publicados nuevos protocolos de PCR en tiempo real para su aplicación en veterinaria. Xu *et al* (2014) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real utilizando cebadores dirigidos a los genes *lig* para el diagnóstico de leptospirosis en caninos. A diferencia de los ensayos en tiempo real descritos, los autores utilizaron un sistema de detección de fluorescencia basado en sondas FRET. El mismo se caracteriza por utilizar dos sondas que al unirse a secuencias adyacentes del ADN diana emiten la fluorescencia que es detectada por el equipo. En su estudio demostraron que la técnica de PCR dirigida a los genes *lig* fue 100 veces más sensible que el ensayo ampliamente aceptado *lipL*32 SYBR y 10 veces más sensible que el ensayo 16S rRNA TaqMan descritos por Levett *et al* (2005) y Smythe *et al* (2002) respectivamente.

Ferreira *et al* (2014) utilizaron una estrategia de PCR en dos etapas. En primer lugar, evaluaron muestras de tejidos animales mediante la utilización de una PCR múltiple dirigida a los genes *lip*32 y adicionando como control interno de amplificación el gen que codifica para la proteína beta-actina. Posteriormente, a partir de las muestras que dieron positivas realizaron la técnica de PCR en tiempo real y secuenciación me-

dianete una combinación cebadores y sondas dirigidos a secuencias de genes *secY* y *ompL1* con el fin de identificar las 4 especies más comunes en veterinaria *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* y *L. noguchii*.

Discusión y conclusiones

Tradicionalmente el diagnóstico de leptospirosis en animales se ha realizado mediante métodos serológicos o microbiológicos. El test serológico de microaglutinación confirma la enfermedad, sin embargo, como se mencionó anteriormente, requiere muestras del período agudo y convaleciente para una correcta interpretación de los resultados. En aquellos animales que padecieron la enfermedad y en aquellas especies que actúan como reservorios la prueba de MAT puede no contribuir al diagnóstico debido al bajo nivel de anticuerpos que se presenta en estos casos. Por su parte, el diagnóstico mediante el cultivo microbiológico requiere de muestras adecuadamente extraídas, acondicionadas y transportadas hasta el laboratorio como también, de un período de incubación prolongado. Por lo tanto, el cultivo no representa un método apto para el diagnóstico precoz de la enfermedad (Gravekamp *et al* 1994; Rahelinirina *et al* 2010).

Es así como la técnica de PCR realizada a partir de muestras de sangre con anticoagulante, plasma o suero representa una ventaja cuando se necesita un diagnóstico temprano de leptospirosis humana (Merien *et al* 2005; Boonslip *et al* 2011). Sin embargo, en veterinaria y en particular en pequeños animales, usualmente los datos sobre la evolución de la enfermedad son desconocidos o ambiguos por lo tanto es recomendable analizar muestras de sangre en conjunto con orina a fin de aumentar la probabilidad de un resultado positivo. Ahmed *et al* (2012), demostraron como disminuye la sensibilidad de la técnica de PCR a partir de sangre entera a medida que progresa la enfermedad debido al descenso del número de *Leptospira* spp. en el torrente sanguíneo. En lo que respecta al diagnóstico de leptospirosis en animales de producción se debe considerar la obtención de muestras de órganos obtenidas durante la necropsia o posterior a un aborto con el propósito de aumentar las probabilidades de un resultado positivo.

Cuando el objetivo se basa en el diagnóstico de animales portadores la técnica de PCR demostró ser superior frente a los métodos tradicionales (Harkin *et al* 2003; Lilenbaum *et al* 2009). No obstante, una importante limitación en estos casos reside en la imposibilidad de varios protocolos de PCR en diferenciar serovares de *Leptospira*. Sin embargo, la utilización de otros cebadores permite la identificación de especies o cepas si los productos de PCR son secuenciados

(OIE 2014). Asimismo, la técnica de PCR identifica la presencia de ADN de *Leptospira* lo que no resulta necesariamente que se encuentren presentes microorganismos viables y transmisibles. Además si se tiene en cuenta que la eliminación de *Leptospira* spp. por orina en estos animales es intermitente, un resultado negativo mediante la técnica de PCR a pesar de su mayor sensibilidad tampoco descartaría el diagnóstico.

Concerniente a los estudios epidemiológicos la aplicación de la técnica de PCR ha permitido la detección de *Leptospira* spp en animales silvestres que actúan como reservorios (Cox *et al* 2005; Doosti *et al* 2012; Koizumi *et al* 2008; Koizumi *et al* 2009 a); Koizumi *et al* 2009 b); Paixão Mdos *et al* 2014; Wu *et al* 2014). Nuevamente una desventaja en estos casos es la falta de identificación de las especies involucradas, lo cual resulta imprescindible para el estudio de las cepas circulantes y su asociación con determinados hospedadores en una región dada. Otra limitación importante en estos casos reside en los procesos de autólisis y descomposición que pudieran sufrir las muestras utilizadas. Shearer *et al* (2014) demostraron resultados discordantes entre una técnica de PCR en tiempo real y la inmunohistoquímica para la detección de leptospirosis en animales silvestres. Cabe destacar de su estudio que la mayor parte de las muestras positivas por inmunohistoquímica fueron negativas por PCR. Esto según el autor, Shearer *et al* (2014) puede deberse a la autólisis de la muestra o los ciclos de congelado-descongelado de las mismas durante el procesamiento lo cual pudo haber impactado negativamente en la detección del ADN de *Leptospira* spp. Otra posibilidad, es la variación genética de las cepas de campo que pudieron haber reducido la eficiencia en la detección mediante el protocolo utilizado.

Al interpretar los resultados obtenidos con la técnica de PCR en cualquier contexto que se utilice se deben considerar ciertos factores. Por un lado, cuando los resultados con la técnica de PCR fueran positivos pero negativos con otros métodos de referencia como la serología o el aislamiento, se deberá determinar si dicha positividad es debida a una mayor sensibilidad de la técnica de PCR o corresponde a falsos positivos (Lilenbaum *et al* 2008; Richtzenhain *et al* 2002; Rojas *et al* 2010). Estos últimos podrían surgir por contaminación con ADN amplificado anteriormente o por amplificación de secuencias semejantes en otros microorganismos (Ahmed *et al* 2012; Villumnsen *et al* 2012). Mientras que, ante resultados negativos es importante considerar la conservación inadecuada de las muestras, desde la obtención hasta su procesamiento, los métodos de extracción inapropiados o la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras extraídas. Por ello se recomienda incluir un control interno de amplificación en cada protocolo además de

los controles de rutina. Asimismo, es importante recordar que *Leptospira* spp. generalmente se encuentran en bajo número y son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos (OIE 2008). Por lo tanto, las muestras deben ser extraídas antes de iniciado el tratamiento y se debe determinar con anterioridad la sensibilidad y especificidad analítica del ensayo a ser aplicado.

Finalmente, ante la elección de un protocolo de PCR determinado es recomendable optar por técnicas de PCR anidada o en tiempo real debido a su mayor sensibilidad y especificidad (Bomfim *et al* 2007; Fornazari *et al* 2012). En relación a los cebadores, una alternativa adecuada sería la elección de dos *targets* diferentes. Por un lado, se podría optar por genes que presenten más de una copia en el genoma como el gen *lig* o el *rrs* con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica; mientras que la utilización en forma conjunta de genes presentes sólo en las especies patógenas incrementará la especificidad de la misma (Bourhy *et al* 2011).

En conclusión, aunque la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil de los métodos de referencia, son necesarios estudios adicionales en relación a la utilización de la misma para el diagnóstico de la enfermedad en animales.

Referencias Bibliográficas

- Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 27; 140 (3-4): 287-96.
- Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC and Vinetz JM. Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction in Leptospirosis Diagnosis: Association of Level of Leptospiremia and Clinical Manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (9): 1249-55.
- Aghaiypour K, Safavieh S. Molecular detection of pathogenic *Leptospira* in Iran. *Arch of Razi Institute.* 2007; 62 (4): 191-7.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One.* 2009; 18; 4 (9): e7093.
- Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR, Hartskeerl RA. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol.* 2012; 3:133.
- Ahmed A, Klaasen H, van der Veen M, van der Linden H, Goris M, Hartskeerl RA. Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of Leptospire in Canine Samples. *Advances in Microbiology.* 2012; 2: 162-70.
- Alemay A. Review on Emerging and Re-Emerging Bacterial Zoonotic Diseases. *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2012; 7 (4): 176-86.
- Azizi S, Tajbakhsh E, Hajimirzaei MR, Gholami Varnamkhasht M, Sadeghian H, Oryan A. Evaluation of "white-spotted kidneys" associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based LipL32 gene in slaughtered cows. *J S Afr Vet Assoc.* 2012 Nov 5; 83(1): 69.
- Balamurugan V1, Gangadhar NL, Mohandoss N, Thirumalesh SR, Dhar M, Shome R, Krishnamoorthy P, Prabhudas K, Rahman H. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *Springerplus.* 2013; 30 (2):362.
- Balassiano IT, Vital-Brazil JM, Pereira MM. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(1):11-5.
- Barker IK, Van Dreumel, A.A. Palmer, N. The alimentary system. In K.F. 1993 *Pathology of domestic animals.* 4th edn. Academic Press, San Diego. pp. 1-318.
- Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech.* 2004; 23 (2):497-511.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (12):757-71.
- Blanco RM, Romero EC. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78(4):343-6.
- Bomfim MR, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC. Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet J.* 2008; 178(2):251-6.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, hierakul W, Limmathurotsakul D, Day NP, Peacock SJ. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infect Dis.* 2011; 13; 11:338.
- 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. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2154-60.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1995; 43 (2): 110-4.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009; 55(4):611-22.
- Cai HY, Hornby G, Key DW, Osuch MR, Maxie MG. Preliminary Study on Differentiation of *Leptospira* Grippotyphosa and *Leptospira* Sejroe from Other Common Pathogenic Leptospiral Serovars in Canine Urine by Polymerase Chain Reaction Assay. *J Vet Diagn Invest.* 2002; 14 (2):164-8.
- Chagas-Junior AD, da Silva CL, Soares LM, Santos CS, Silva CD, Athanzio DA, dos Reis MG, McBride FW, McBride AJ. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. *PLoS One.* 2012; 7(2):e32712.
- Cheemaa PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, Sandey M. Detection of pathogenic leptospire in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(6):568-73.

- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007; 75(5):2441-50.
- Cox TE, Smythe LD, Leung LK. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species. *J Wildl Dis*. 2005; 41(4): 753-7.
- Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis*. 2009; 19 (1 Suppl 1): S1-37-41.
- de Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas VL, Caló Romero E, Spinosa C, Arroyo Sanches MC, da Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(11): 1699-707.
- Djadid ND, Ganji ZF, Gouya MM, Rezvani M, Zakeri S. A simple and rapid nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 63(3): 251-6.
- Doosti A., Ahmadi R., Arshi A. PCR Detection of leptospirosis in Iranian Camels. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2012; 15(3): 178-83.
- Draghi MG, Brihuega B, Benítez D, Sala JM, Biotti GM, Pe-reyra M, Homse A, Guariniello L. Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev Argentina Microbiol*. 2011; 43: 42-4.
- Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(7):2731-3.
- Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, Woodward MJ. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res Vet Sci*. 2008; 85(1):8-16.
- Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A, Thompson G, Hartskeerl RA, Inácio J. Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. *PLoS One*. 2014 Nov 14; 9(11):e112312.
- Fornazari F, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HE, Luvizotto MC, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods*. 2012; 90(3):321-6.
- Fraune CK, Schweighauser A, Francey T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc*. 2013; 5; 242(10):1373-80.
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006; 363 (1-2): 32-47.
- González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 15; 7(12):941-5.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic *Leptospira* by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993; 139 (8): 1691-700.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th Edition Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-8138-1237-3.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 2000; 68(4):2276-85.
- Hamond C, Martins G, Medeiros MA, Lilienbaum W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. *J Equi Vet Sc*. 2013; 33 1157-1159.
- Harkin KR a, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 1; 222(9):1224-9.
- Harkin KR b, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 1; 222(9): 1230-3.
- Helmerhorst HJF, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, Hovius JW. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med*. 2012 70 (5): 215-21.
- Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods*. 2011; 84(1): 1-7.
- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5):1863-8.
- Jafari D, Shahbazkia HR., Ronagh N. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. *Iran J Microbiol*. 2011; 3(3):135-9.
- Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol Immunol*. 2001; 45(6):491-6.
- Koizumi N, Muto M, Yamamoto S, Baba Y, Kudo M, Tamae Y, Shimomura K, Takatori I, Iwakiri A, Ishikawa K, Soma H, Watanabe H. Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(6):465-8.
- Koizumi N, Muto M, Yamada A, Watanabe H. Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009; 71(6):797-9. A)
- Koizumi N, Uchida M, Makino T, Taguri T, Kuroki T, Muto M, Kato Y, Watanabe H. Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009; 71(4):425-9. B)
- Krishnappa J, Susheela B, Beena PM, Dhananjaya CD. Leptospirosis A Case Report of a Patient with Unusual Pul-

- monary Involment. J Clin Biomed Sci 2012 ; 2 (1).
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006; 27 (2-3): 95-125.
- Levett P. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2): 296-326.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(Pt 3):671-3.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005; 54(Pt 1):45-9.
- Li Cavoli G, Tortorici C, Bono L, Ferrantelli A, Giammarresi C, Rotolo U. Acute renal failure in Weil's disease. Dial Traspl. 2013; 34(1):33-5.
- Lilenbaum W, Varges R, Brandão FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology. 2008 15; 69(7):837-42.
- Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. Res Vet Sci. 2009; 87(1):16-9.
- Lourdault K, Florence Aviat and Mathieu Picaudeau. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 5):648-55.
- Luchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 2004 ; 37(2):131-4.
- Magajevski FS, Silva Girio RJ, Mathias LA, Myashiro S, Élide Genovez M, Scarcelli EP. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian Journal of Microbiology. 2005; 36:43-47.
- Maxie MG. The urinary system, in K.F. 1993 Jubb, P.C.N. Kennedy & N. Palmer, (eds.) Pathology of domestic animals. 4th edn. Academic Press, San Diego. pp. 447–538.
- McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 2007. 4th edn. Mosby-Elsevier, St Louis.
- Meira CD, Wenceslau AA, Santos Carvalho F, Xavier Correa JM, Rêgo Albuquerque G. Detecção molecular de leptospira em amostras de urina de cães infectados naturalmente. Veterinária e Zootecnia 2011; 18(2): 249-254.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons Saint I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol. 1992; 30 (9): 2219-24.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 2005 1; 249(1):139-47.
- Michinos M, Rood JI, Faine S, Adler B. Molecular analysis of a *Leptospira borgpetersenii* gene encoding an endoflagellar subunit protein. J Gen Microbiol. 1991; 137(7):1529-36.
- Monte LG, Jorge S, Luiz JP, Sinnott F, Seixas KS, Aleixo JA, Samartino LE, Conceição FR, Hartleben CP. Diagnosis of canine leptospirosis using an immunomagnetic separation-PCR method. Braz J Microbiol. 2012 Apr; 43(2):602-5.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(4):459-77.
- Natarajaseenivasan K, Raja V, Narayanan R. Rapid diagnosis of leptospirosis in patients with different clinical manifestations by 16S rRNA gene based nested PCR. Saudi J Biol Sci. 2012; 19 (2):151-5.
- Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014; 56(5):411-5.
- OIE 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Chapter 2.1.9), World Organization for Animal Health. ISBN 978-92-9044-718-4.
- OIE 2014. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Chapter 2.1.9), World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> consultado 23/3/15.
- Paixão Mdos S, Alves-Martin M, Tenório Mda S, Starke-Buzetti WA, Alves ML, da Silva DT, Ferreira AG, Floró e Silva M, Sousa LO, Lucheis SB. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. Prev. Vet. Med. 2014. 1;115 (1-2): 69-73.
- Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect Immun. 2002; 70(11):5924-30.
- Palaniappan RU1, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol Cell Probes. 2005 Apr; 19(2):111-7.
- Picaudeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol Microbiol. 2001; 40(1):189-99.
- Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W, Medeiros MA. Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. Vet Microbiol. 2011 Dec 15;153(3-4):413.
- Rahelinirina S, Leon A, Harstkeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J, Rahalison L, Cornet M. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. PLoS One. 2010 Nov 24;5 (11):e14111.
- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Martins Soares R, Miyoshi Sakamoto S, Vasconcellos SA, Morais Higaa ZM, Scarcelli E, Genovez ME. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet Microbiol. 2002; 20; 87(2):139-47.
- Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. Serologic and Urinary PCR Survey of Leptospirosis in Healthy Cats and in Cats with Kidney Disease. J Vet Intern

Med. 2014; 28(2):284-93.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Oct; 29(10):1305-9.

Scarcelli E, Piatti RM, Luzes Fedullo JD, Simon F, Vasconcellos Cardoso M, Castro V, Miyashiro S, Genovez ME. *Leptospira* spp detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*) Braz J Microbiol. 2003; 34:143-146 ISSN 1517-8382 143.

Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Garcia Messina O, Collia O, Bassadoni D, Schtirbu R, Olenchuk A, De Mazzonelli GD, Parma A. Distres Respiratorio debido a Hemorragia Pulmonar por Leptospirosis. *Medicina (Bs As)* 2002; 62 (2): 135-40.

Shearer KE, Harte MJ, Ojkic D, DeLay J, Campbell D. Detection of *Leptospira* spp. in wildlife reservoir hosts in Ontario through comparison of immunohistochemical and polymerase chain reaction genotyping methods. *Can Vet J*. 2014; 55(3):240-8.

Slack A, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 2006; 27; 6:95.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis*. 2002; 8 (2):13.

Soto FRM, De Azevedo SS, De Moraes ZM, Pinheiro SR, DeLbem ACB, Moreno AM, Paixão R, Vuaden ER, Vasconcellos SA. Detection of *Leptospires* in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*. *Braz J of Microbiol*. 2006; 37:582-6.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(3):247-55.

Talpada MD1, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2003; 3(3):141-7.

Tansuphasiri U, Chanthadee R, Phulsuksombati D, Sangjun N. Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic *Leptospira*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(2):297-308.

Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One*. 2011; 24; 6(1):e16236.

Van Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, Ter Schegget J, Terpstra WJ. Detection of *Leptospires* in Urine by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 27 (10): 2258-62.

Vein J, Perrin A, Berny PJ, Benoit E, Leblond A, Kodjo A. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can J Microbiol*. 2012; 58 (7): 828-35.

Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, Hartskeerl RA. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*. 2008; 16; 3(7):e2752.

Villumsen S, Pedersen R, Binderup Borre M, Ahrens P, Skov Jensen J, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(1):184-90.

WHO, ILS (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization. ISBN 9241545895.

Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(10):3741-51.

Wilson K, Walker J. 2005. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 6th. Ed. Cambridge University Press. New York. U.S.A.

Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 1;150(1):9-18.

Woodward MJ, Sullivan GJ. Nucleotide sequence of a repetitive element isolated from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis*. *J Gen Microbiol*. 1991; 137 (5):1101-9.

Wu Q1, Prager KC, Goldstein T, Alt DP, Galloway RL, Zuerner RL, Lloyd-Smith JO, Schwacke L. Development of a real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in California sea lions. *Dis Aquat Organ*. 2014 Aug 11;110(3):165-72.

Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. Diagnosis of Canine Leptospirosis by a Highly Sensitive FRET-PCR Targeting the lig Genes. *PLoS One*. 2014 Feb 24; 9(2):e89507.

Yasouri SR, Ghane M. A comparison between culture and PCR technique order to isolate and identify *Leptospira* spp. from environmental samples in the northern part of Iran. *European J Experimental Biology*. 2014; 4 (3):606-611.

Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect Genet Evol*. 2010; 10 (2):273-7.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.