

ISSN 1905-5048

Thai NIAH
eJournal



<https://zhort.link/uw7>

วารสาร



สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

ปีที่ 17 ฉบับที่ 2

วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai NIAH eJournal)

เป็นวารสารอิเล็กทรอนิกส์สำหรับเผยแพร่ผลงานวิจัยหรือผลงานวิชาการด้านสัตวแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ กำหนดออกปีละ 3 ฉบับ (ฉบับที่ 1 พฤษภาคม – สิงหาคม, ฉบับที่ 2 กันยายน – ธันวาคม และฉบับที่ 3 มกราคม – เมษายน)

ประเภทของผลงานเผยแพร่

1. ผลงานวิจัยหรือผลงานวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานด้านสัตวแพทย์และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพสัตว์ ตั้งแต่งานวิจัยพื้นฐานจนถึงงานวิจัยประยุกต์ขั้นสูง ซึ่งไม่ซ้ำซ้อนกับเรื่องที่เคยเผยแพร่ที่ใดมาก่อน
2. การพัฒนาและค้นคว้าวิจัยทางวิชาการในห้องปฏิบัติการ นวัตกรรมหรือเทคโนโลยีในสาขาที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพสัตว์ โดยอธิบายสิ่งที่ค้นพบใหม่ที่น่าสนใจ มีหลักฐานที่แน่ชัดในการสรุปผลการศึกษา และถูกต้องตามหลักวิชาการ ซึ่งมีประโยชน์ต่องานในสาขาตนเองหรือมีประโยชน์สำหรับนำไปใช้ในงานด้านอื่น
3. บทความปริทัศน์ (review article) เป็นบทความทางวิชาการที่นำเสนอสาระซึ่งรวบรวม เรียงเรียง ผ่านการวิเคราะห์และสังเคราะห์จากแหล่งข้อมูลต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ทางด้านสุขภาพสัตว์ โดยมีการอ้างอิงที่มาและแหล่งข้อมูลอย่างชัดเจน
4. รายงานสัตว์ป่วยหรือกรณีศึกษาซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจ โดยเน้นที่กระบวนการวิเคราะห์และกระบวนการให้ได้มาซึ่งข้อสรุปอย่างมีแบบแผน อันเป็นประโยชน์ทางสัตวแพทย์
5. บทความพิเศษ เป็นข้อมูลประเด็นความรู้เฉพาะทาง การเสนอแนะหัวข้อที่เป็นประเด็นที่น่าสนใจ หรือเรื่องอื่นที่กองบรรณาธิการพิจารณาเห็นสมควรซึ่งจะผ่านการเชิญจากกองบรรณาธิการ

ระเบียบการเผยแพร่ผลงาน

1. ผลงานของผู้วิจัยของหน่วยงานในสังกัดสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จะต้องผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการ พิจารณาโครงการวิจัยและผลงานวิชาการ (กวช.) ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และได้รับเลขทะเบียนวิจัย/เลขทะเบียนผลงานวิชาการจากกลุ่มพัฒนาวิชาการปศุสัตว์ (กวป.) หรืออยู่ระหว่างการรอเลขทะเบียนฯ หลังจากที่ยื่นเรื่องไปยัง กวป. แล้ว หากเป็นโครงการวิจัยของนักวิชาการภายใต้สังกัดกรมปศุสัตว์จะต้องผ่านการพิจารณาตามระเบียบกำหนดของกรมปศุสัตว์
2. ต้นฉบับที่ส่งมาเพื่อรับการพิจารณาจะต้องไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารใดมาก่อน และไม่อยู่ระหว่างเสนอขอตีพิมพ์ในวารสารอื่น
3. งานวิจัยที่ทำในสัตว์ทดลอง ให้แสดงหมายเลขกิจกรรมและหนังสือรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของหน่วยงาน พร้อมทั้งระบุลงในอุปกรณ์และวิธีการด้วย
4. รูปแบบการเขียนและเค้าโครงเรื่อง ต้องเป็นไปตามที่ Thai-NIAH eJournal กำหนดไว้
5. ผลการศึกษาและข้อคิดเห็นของผู้เขียนที่ตีพิมพ์ในเนื้อหา เอกสารอ้างอิง การขออนุมัติ/ ขออนุญาตเผยแพร่ การตรวจพิสูจน์อักษร เป็นความรับผิดชอบของผู้เขียน
6. ห้ามเปลี่ยนแปลง ดัดแปลง แก้ไข เพิ่มเติมลงในผลงาน หลังจากผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของผลงานครั้งสุดท้ายจากบรรณาธิการแล้ว
7. หากมีการคัด คัดลอกข้อความ หรือแนวคิดจากงานเขียนอื่นลงในผลงานฉบับนี้ ผู้เขียนต้องขออนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้เขียนที่เป็นเจ้าของและแสดง credit ของแหล่งที่มาในบทความด้วย หากตรวจพบว่ามี การคัดลอก หรือลอกเลียนผลงาน (plagiarism) จะไม่อนุญาตให้เผยแพร่ใน Thai-NIAH eJournal

สารจากบรรณาธิการ

วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai – NIAH eJournal) ปีที่ 17 ฉบับที่ 2 (กันยายน – ธันวาคม 2565) เสนอผลงานวิชาการที่น่าสนใจเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปรา เรื่องการพัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR เพื่อตรวจและจำแนกกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา กองบรรณาธิการขอขอบคุณผู้ประเมินบทความที่สละเวลาให้ความคิดเห็นและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อกองบรรณาธิการและเจ้าของผลงานในการพัฒนาผลงานวิชาการ ขอขอบคุณนักวิชาการที่ส่งผลงานเผยแพร่ในวารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติฉบับนี้ และหวังว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ของนักวิชาการเจ้าของผลงานและเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจทุกท่านด้วย สำหรับผู้ที่สนใจส่งผลงานเพื่อเผยแพร่ สามารถดูรายละเอียดได้ในเว็บไซต์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หรือติดต่อกองบรรณาธิการได้ที่ niah8@dld.go.th

กองบรรณาธิการ

ผู้ประเมินบทความ วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai NIAH eJournal) ปีที่ 17 ฉบับที่ 2

1. สพ.ญ. ดร. มัญชรี ทัตติยพงศ์
2. ดร.ทวิวัฒน์ ดีมะการ
3. คุณอนุสรณ์ อยู่เย็น

กองบรรณาธิการ วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เลขที่ 50/2 เกษตรกลาง ซอยพหลโยธิน 45 แยก 15 (ถนนทวีศักดิ์เสสเวช)

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร 025798910 email: niah8@dld.go.th

สารบัญ

วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
ปีที่ 17 ฉบับที่ 2 (กันยายน – ธันวาคม 2565)

เรื่อง

หน้า

Development of multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Leptospira* spp. 1 - 12

Duangjai Suwancharoen Busara Sittiwicheanwong Chatsuda Suraphi Waree Sookmai

การพัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR เพื่อตรวจและจำแนกกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา

Development of multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Leptospira* spp.

ดวงใจ สุวรรณเจริญ* บุษรา สิทธิวิเชียรวงศ์ ฉัตรสุดา สุระภี วรี สุขไม้

Duangjai Suwancharoen* Busara Sittiwicheanwong Chatsuda Suraphi Waree Sookmai

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira* spp. which are classified based on their divergent genomes and ability to cause disease, namely, pathogenic, intermediate, and non-pathogenic groups. Recent studies on intermediate *Leptospira* spp. demonstrated that they are infectious *Leptospira* spp. and cause leptospirosis. It is necessary to develop an assay to detect all groups of *Leptospira* spp. Thus, this study aims to develop multiplex real-time PCR to detect *Leptospira* genus and distinguish 3 groups of *Leptospira* spp. using four primer-probe sets that were designed from 16S rRNA, lipL32, and 23S rRNA gene sequences. Multiplex real-time PCR assays were optimized for the condition and were assessed for analytical sensitivity and analytical specificity using 17 serovars of reference *Leptospira* spp. The results showed that the assay can detect all 17 serovars of reference *Leptospira* spp. and differentiate them into 3 groups correctly with analytical sensitivity at 100 cells/ml and 100% analytic specificity. Then, twenty isolated *Leptospira* spp. from clinical and environmental specimens were tested with multiplex real-time PCR for group identification and confirmed the results with the results from 16S rRNA sequencing. All group identification results of isolated *Leptospira* spp. were consistent with partial 16S rRNA sequence results. In conclusion, the developed multiplex real-time PCR assay has enabled concurrent detection and identification in a single reaction with high sensitivity and specificity. This method provides rapid results and valuable epidemiological data. However, the evaluation of diagnostic performance of multiplex real-time PCR directly on clinical specimens still requires further study.

Keywords: Multiplex real-time PCR, *Leptospira* genus, pathogenic *Leptospira* spp., intermediate *Leptospira* spp., non-pathogenic *Leptospira* spp.

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 50/2 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

*ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 02-5798908-14 โทรสาร 02-5798919 อีเมล: dj90705@hotmail.com

National Institute of Animal Health 50/2 Phahonyothin Road, Lad Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author: Tel. 02-5798908-14 Fax. 02-5798919 e-mail: dj90705@hotmail.com

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดเชื้อระหว่างสัตว์และคนที่เกิดจากเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งเชื้อเลปโตสไปรานั้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามความแตกต่างของจีโนมและความสามารถในการก่อโรค คือ กลุ่มก่อโรค กลุ่ม intermediate และกลุ่มไม่ก่อโรค ปัจจุบันได้มีการศึกษามากขึ้นพบว่าเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่ม intermediate มีความสามารถในการก่อโรคได้เช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคให้ครอบคลุมเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี multiplex real-time PCR ที่ครอบคลุมทั้งการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปรา และจำแนกเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 3 กลุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ 4 ชุด ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*, *lipL32* และ *23S rRNA* นำไพรเมอร์และโพรบมาทดสอบกับเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงจำนวน 17 ซีโรวาร์ ด้วยวิธี multiplex real-time PCR เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมพร้อมทั้งหาความไวและความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ของวิธี ผลการทดสอบพบว่าวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิง และจำแนกเชื้อได้ทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยความไวเชิงวิเคราะห์ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีความจำเพาะเชิงวิเคราะห์ 100% และเมื่อนำเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกและสิ่งแวดล้อมจำนวน 20 ไอโซเลท มาทดสอบกับวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น และยืนยันผลกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลการจำแนกกลุ่มตรงกับผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ตรวจและระบุกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราได้พร้อมกันทุกกลุ่ม มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งนอกจากจะให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วแล้วยังสามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ในทางระบาดวิทยาได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมหากนำวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสกับตัวอย่างทางคลินิกโดยตรง

คำสำคัญ: Multiplex real-time PCR จินัสเชื้อเลปโตสไปรา เชื้อเลปโตสไปราก่อโรค เชื้อเลปโตสไปรากลุ่ม intermediate เชื้อเลปโตสไปรากลุ่มไม่ก่อโรค

Introduction

Leptospirosis is an infectious disease that is recognized as a worldwide re-emerging zoonotic disease, especially in tropical and subtropical countries, and unsanitary areas (Adler, 2015; Costa et al., 2015). *Leptospira* spp. can harbor in kidney of infected animals. The disease can be transmitted via urine by different animal species, including rats, horses, cattle, dogs, cats, swine, and buffaloes (Narkkul et al., 2021). In animals, abortion or internal organ hemorrhage is the most common clinical sign. However, persistent infections can also occur, resulting in large economic losses (Pérez et al., 2020).

Leptospira spp. are spiral gram-negative bacteria with flagella for motility. *Leptospira* spp. is categorized into family *Leptospiraceae*, order *Spirochaetales*, and genus *Leptospira* (Cameron, 2015). Initial classification of *Leptospira* spp. divided them into 2 species which were *Leptospira interrogans* (pathogenic group) and *Leptospira biflexa* (non-pathogenic group). They were then classified serologically into serogroups and serovars. Currently, 350 serovars have been identified and a specific serovar may belong to multiple species (Romero-Vivas et al., 2013; Krishnan & Ganesh, 2020). Genetic classification dependent on *16S rRNA* can distinguish *Leptospira* spp. into 3 groups which are pathogenic group (9 genomospecies), intermediate group (6 genomospecies), and non-pathogenic group (7 genomospecies) (Picardeau, 2013). The difference in base pairs of *16S rRNA* genes between pathogenic and intermediate

groups is 70-76 bp (Morey et al., 2006). Recently, the classification has been revised, demonstrating that intermediate genomospecies share a similar ancestral root with pathogenic genomospecies. Both are classified as infectious *Leptospira* spp. and subdivided into 2 clades: P1 (pathogenic group) and P2 (intermediate group) (Vincent et al., 2019). Although intermediate *Leptospira* spp. have been found in febrile cases in humans (Chiriboga et al., 2015) and causing fever, anorexia, icterus, and weight loss in dogs (Piredda et al., 2021), explicit clinical symptoms that distinguish the infection-causing from the pathogenic or intermediate groups have yet to be clearly established (Vincent et al., 2019).

Most studies employ PCR or real-time PCR assay targeting *gryB*, *rrs*, and *secY* to detect *Leptospira* genus, or *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA*, and *ligB* to detect pathogenic *Leptospira* spp. (Thaipadungpanit et al., 2011). Detection of the *lipL32* gene, in particular, has been used in several studies limited to pathogenic *Leptospira* spp. However, the assay does not cover intermediate *Leptospira* spp. (Levett et al., 2005; Stoddard et al., 2009; Ahmed et al., 2020), despite being infectious and can cause disease. Multiplex real-time PCR was used in many studies to distinguish *Leptospira* spp. from other pathogens, for example, *Plasmodium* parasites, *Brucella* spp., *Campylobacter foetus*, Dengue virus, and Chikungunya virus (Selim et al., 2014; Waggoner et al., 2014; Giry et al., 2017). Moreover, most research on using multiplex real-time PCR to distinguish between groups of *Leptospira* spp. has been focused on separating between pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp. (Bedir et al., 2010) or between pathogenic and intermediate *Leptospira* spp. (Pérez et al., 2020). Nevertheless, the studies that developed multiplex real-time PCR to differentiate 3 groups of *Leptospira* spp. have not been found yet.

This research aims to develop a multiplex real-time PCR to detect *Leptospira* spp. along with classifying groups of *Leptospira* spp. using 4 specific primer-probe sets based on TaqMan probe assay. The first one was gene-specific *Leptospira* genus (screening test), and others were specific to pathogenic group, intermediate group, and non-pathogenic group. The assay was evaluated analytical sensitivity, analytical specificity, and group identification performance.

Materials and methods

Primers and probes design

Ninety-seven *Leptospira* spp. sequences were retrieved from GenBank based on sequence integrity, and they represented all 3 groups of *Leptospira* spp. as well as unreplicative serovars. They consisted of 52 sequences of 16S rRNA gene from *Leptospira* spp., 21 sequences of *lipL32* gene from pathogenic *Leptospira* spp., 18 sequences of another region of 16S rRNA from intermediate *Leptospira* spp., and 6 sequences of 23S rRNA gene from non-pathogenic *Leptospira* spp.

Nucleotides of each gene were aligned by ClustalW in MEGA X software (Kumar et al., 2018). The overlapping nucleotides were assigned in the Primer-BLAST program on the NCBI website (Ye et al., 2012) for designing primers and probes. Four primer-probe sets were evaluated for T_m value and GC content. They were tested for specificity of each primer and probe *in silico* with ClustalW in MEGA X software. Then, the primers and probes were synthesized by Sigma-Aldrich (Germany).

Sample preparation

Reference *Leptospira* spp.

Seventeen serovars of *Leptospira* spp. were received from WHO/FAO/OIE Collaboration center for reference and research on leptospirosis, Australia and KIT Royal Tropical Institute, Netherlands, which covered 3 groups of *Leptospira* spp. to test in multiplex real-time PCR assay. They were maintained in National Institute of Animal Health (NIAH) laboratory by subculturing them in Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH) broth and incubated at 30°C for 7 days. To optimize real-time PCR conditions and test analytical specificity, each serovar of *Leptospira* spp. was performed cell enumeration using a Petroff-Hausser counting chamber and adjusted the number of cells with phosphate buffered saline (PBS) to 10⁶ cells/ml. Another set of 10⁶ cells/ml of *Leptospira* spp. was 10-fold diluted from 10⁶ cells/ml to 1 cell/ml for testing sensitivity.

Isolated *Leptospira* from clinical and environmental specimens

Twenty isolated *Leptospira* spp. from 16 clinical specimens and 4 environmental specimens in Thailand from 2016 to 2019 have been maintained in NIAH laboratory by subculturing in EMJH broth and incubated at 30°C. The twenty isolates were isolated from 10 specimens of cattle urine from Bangkok, Ratchaburi, Chon Buri, Mukdahan, Tak, and Buri Ram, 2 specimens of buffalo blood from Phatthalung, 1 specimen of rat urine from Nakhon Si Thammarat, 1 specimen of rat kidney, 2 specimens of soil, and 4 specimens of surface water from Nan. Specimens were cultured in EMJH broth at 30°C and observed under a dark-field microscope every week until spirochetes were found or until 3 months. Suspected positive specimens were confirmed *Leptospira* genus by 16S rRNA real-time PCR.

Genetic material

Leptospira DNA were extracted by QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN®, Germany). The quantity and purity were determined by spectrophotometer (DeNovix®, USA). DNA of other bacteria including, *Brachyspira* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, and *Vibrio cholerae* for specificity test were obtained from Bacteriology and Mycology section, NIAH.

Multiplex real-time PCR assay

All assays were probe-based real-time PCR (TaqMan). Each reaction proceeded in a total volume of 25 µl consisting of 1x FastStart essential DNA probe master (Roche®, Germany), 0.4 µM of each primer, 0.2 µM of each probe, nuclease free water (Roche®, Germany), and 5 µl of DNA template. An individual real-time PCR assay was implemented to select the annealing temperature for the multiplex real-time PCR assay. The thermal cycling conditions were as follows: 1 cycle of pre-denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing and extension at the optimized annealing temperature for 30 seconds, and 1 cycle of cooling at 40°C for 30 seconds. All experiments were repeated at least 3 times to test their reproducibility. All analyses were carried out using the LightCycler® detection system (Roche®, Germany). The result that has quantification cycle (Cq) value <40 means positive result.

Analytical sensitivity and analytic specificity of multiplex real-time PCR assay

Leptospira interrogans serovar Canicola, *L. inadai* serovar Lyme, and *L. biflexa* serovar Patoc I were used in this study to represent the pathogenic, intermediate, and non-pathogenic groups,

respectively. To determine the analytical sensitivity, the assay using 4 primer-probe sets amplified each 10-fold dilution of *Leptospira* spp. from 10^6 cells/ml to 1 cell/ml to establish the limits of detection (LOD). The assay was tested in triplicate. Amplification efficiency (E) of multiplex real-time PCR assay was measured from each slope of standard curve and calculated using the equation: $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$ (Čepin, 2017).

Analytical specificity was determined in triplicate on DNA of 17 serovars of references *Leptospira* spp. and 10 other bacteria using 4 primer-probe sets. The amplification results examined the cross-reactivity between *Leptospira* groups and other bacteria. The analytical specificity were defined by the concept of inclusivity, exclusivity, and selectivity (Pérez et al., 2020).

Group identification performance

DNA was extracted from the 20 isolated *Leptospira* spp. and tested with the multiplex real-time PCR assay to evaluate group identification performance. The results of group differentiation were confirmed with the 16S rRNA sequencing results. An 16S rRNA (~1,480 bp) was amplified by PCR using bacterial universal primers (P16S-8UA [5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'] and P16S-1485R [5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3']). PCR amplification condition was 1 cycle of pre-denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 96°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 90 seconds, and 1 cycle of final extension at 72°C for 7 minutes (Saito et al., 2013) PCR products were purified and sequenced by SolGent Co., Ltd. (Korea) then the sequences were compared to the database via BLAST (Altschul et al., 1990).

Results and discussion

Multiplex real-time PCR assay

Genus-specific and group-specific primers and probes designed in this study were shown in Table 1. The 16S rRNA gene aims to detect the genus of *Leptospira* spp. based on a conserved region at 726-902 bp of GenBank accession no: NR_116542, while another region of 16S rRNA was designed based on a particular region at 570-1081 bp of intermediate *Leptospira* spp. of GenBank accession no: NR_115296. The *lipL32* gene and 23S rRNA gene were used to detect pathogenic *Leptospira* spp. and non-pathogenic *Leptospira* spp., respectively. Each set was optimized with 17 serovars of reference *Leptospira* spp. using a single real-time PCR for an individual annealing temperature. It can be seen from the data in Table 1 that optimized annealing temperature was 62°C for genus and intermediate group, and 60°C for pathogenic and non-pathogenic groups.

Multiplex real-time PCR was performed at the optimized annealing temperature of each primer and probe. Both annealing temperatures at 60°C and 62°C can amplify the template. But 60°C demonstrated non-specific amplification at late cycles, while 62°C did not show any non-specific amplification. Thus, 62°C was selected to be the annealing temperature for the multiplex amplification. The thermal conditions for multiplex real-time PCR assay were 1 cycle of pre-denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing and extension at 62°C for 30 seconds, and 1 cycle of cooling at 40°C for 30 seconds.

Table 1 Primers and probes were used in multiplex real-time PCR.

Target groups	Genes	Primer ID	Sequences (5' → 3')	Annealing Temperature	Source
<i>Leptospira</i> spp. (Genus)	16S rRNA	F_16S_GE	ACGGGATTAGATACCCCGGT	62°C	This study
		R_16S_GE	TTAAACCACATGCTCCACCG		This study
		P_16S_GE	HEX-CGGATTAAGTAGACGCGCTGGGGA-BHQ1		This study
Pathogenic	<i>lipL32</i>	F_lipL32_PA	AGCTCTTTTGTCTGAGCGAG	60°C	This study
		R_lipL32_PA	ACGAACTCCCATTTCAGCGA		This study
		P_lipL32_PA	FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ1		(Stoddard et al., 2009)
Intermediate	16S rRNA	F_16S_INTER	GTGGCCTGCACCTTGAACTA	62°C	This study
		R_16S_INTER	CAACTHAATGGTAGCAACATACGA		This study
		P_16S_INTER	Cy5-CGAAGGCGACTTGCTGGCTCAA-BHQ2		This study
Non-pathogenic	23S rRNA	F_23S_NON	TAGCTTTAGGGTTAGCGTGTA	60°C	This study
		R_23S_NON	CACATCCTTTACCACTTAGCGTAG		This study
		P_23S_NON	Texas Red-AAGGGAAACAGCCCAGACCGTC-BHQ2		This study

This study used 23S rRNA to distinguish non-pathogenic *Leptospira* from the other groups similar to previous research that used multiplex real-time PCR to discriminate between pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp. using *ligA/B* and 23S rRNA, respectively (Bedir et al., 2010). This indicates that 23S rRNA is suitable for detection of non-pathogenic *Leptospira* spp. In addition, our study used *lipL32* to detect pathogenic *Leptospira* spp. but the *lipL32* gene sequences was different from intermediate group (Sykes et al., 2022), and percent similarity of lipL32 protein was 67% (Murray, 2013). Thus, it cannot use a single gene to detect both pathogenic and intermediate groups. For this reason, Intermediate *Leptospira* spp. were missed and significantly underreported because most routine diagnostic tests detected only pathogenic *Leptospira* spp. and did not consider intermediate *Leptospira* spp. in the assay. Likewise, Bedir et al. (2010) study, even though the intermediate group can cause mild symptoms in humans and animals (Chiriboga et al., 2015; Piredda et al., 2021).

On the contrary, this study recognized the significance of intermediate group. The multiplex real-time PCR assay included the detection of intermediate *Leptospira* spp. using 16S rRNA. This is similar to Pérez et al. (2020) study. Their study pointed out that different regions of 16S rRNA can distinguish intermediate *Leptospira* spp. from pathogenic *Leptospira* spp. However, our study developed 4-plex real-time PCR in a single reaction to detect 3 groups of *Leptospira* spp. which differs from Pérez et al. (2020) study. Their assay comprised 2 steps of real-time PCR. First, duplex real-time PCR detected infectious groups (pathogenic and intermediate *Leptospira* spp.) and pathogenic *Leptospira* spp. Suppose the result was ambiguous, such as a positive result for the infectious group and a negative result for the pathogenic group. In that case, the assay must be confirmed for the intermediate *Leptospira* spp. using a single real-time PCR as a second step. But their assay was overlooked for detecting non-pathogenic group.

Analytical sensitivity and analytical specificity

The analytical sensitivity of multiplex real-time PCR was determined by using 10-fold dilution ranging from 10⁶ cells/ml to 1 cell/ml of group-represented reference *Leptospira* spp. The E values of each reaction were 90%–110% with a coefficient of determination (R²) greater than 0.99 in all

primer-probe sets, as described in Figure 1. The E value refers to amplification efficiency which each replication cycle should ideally double the number of a target sequence resulting in a 100% amplification efficiency (Čepin, 2017). The E values at 90%-110% are deemed acceptable for real-time PCR, and the R^2 greater than 0.985 indicates that this assay is reliable in terms of pipetting precision and the range of assay (Rogers-Broadway & Karteris, 2015). Moreover, this study revealed the LOD of multiplex real-time PCR at 100 cells/ml (Figure 1) and can detect the targets in 100% of all replicates. This assay has a LOD equal to the Bedir et al. (2010) assay which detected *ligA/B* and *23S rRNA* of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp., respectively.

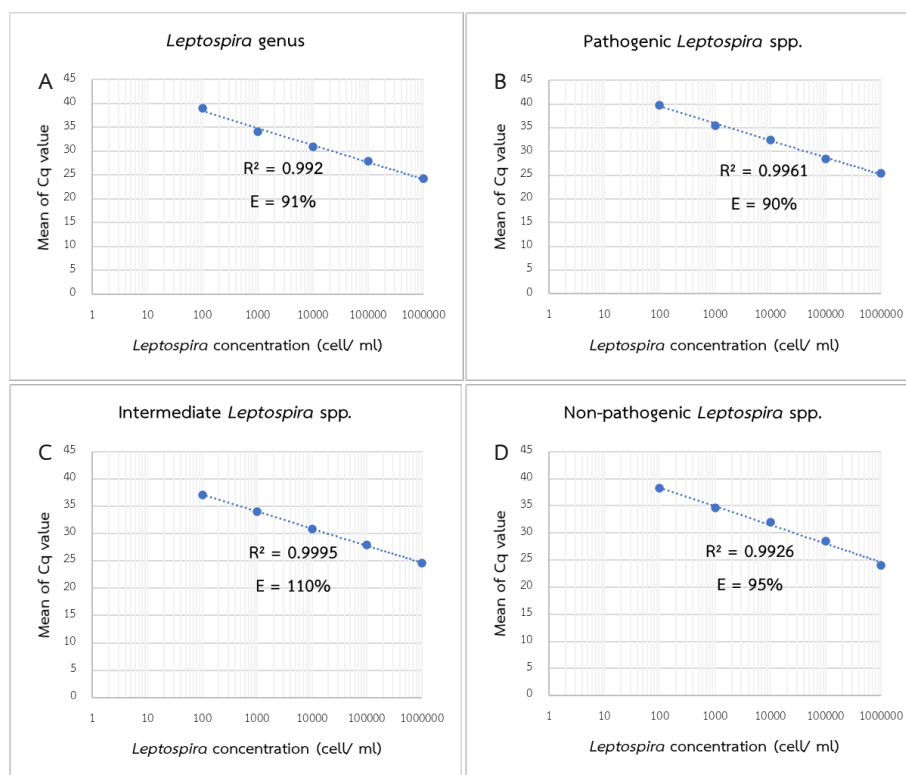


Figure 1 The standard curve of multiplex real-time PCR assay using 4 primer-probe sets in a reaction to amplify 10-fold dilution of (A) *Leptospira* genus, (B) pathogenic *Leptospira* spp., (C) intermediate *Leptospira* spp., and (D) non-pathogenic *Leptospira* spp. showed each LOD at 100 cells/ml and the amplification efficiencies (E) ranged from 90%–110% with a coefficient of determination (R^2) greater than 0.985.

In order to assess analytical specificity, 17 serovars of reference *Leptospira* spp., including pathogenic, intermediate, and non-pathogenic groups, and 10 other bacteria were tested. The performance of multiplex real-time PCR showed 100% specificity in each *Leptospira* group and established neither inter-assay cross reaction nor discordant reaction (Table 2). Our study showed inclusivity by detecting all *Leptospira* spp. in the panel, and group-specific primers can detect all *Leptospira* spp. in their group without showing inter-assay cross reaction and discordant results (Table 2). Likewise, this assay did not amplify 10 other bacteria, indicating that the primers in this study were exclusive and selective for genus and groups of *Leptospira* spp. as designed. From the results of analytical sensitivity and analytical specificity, we can infer that this assay accomplished the critical parameters, including accurate design of suitable primers and probes, and appropriate optimization of reaction parameters.

Table 2 Cq values of multiplex real-time PCR using reference *Leptospira* spp. and other bacteria as a template.

Groups	Species	Serovars	Strains	Multiplex real-time PCR (mean Cq $\pm$ SD)			
				16S rRNA ^a	lipL32	16S rRNA ^b	23S rRNA
Pathogenic	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV	24.11 $\pm$ 0.32	25.62 $\pm$ 0.14	No Cq	No Cq
	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	24.65 $\pm$ 0.14	26.61 $\pm$ 0.23	No Cq	No Cq
	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C	24.17 $\pm$ 0.19	26.32 $\pm$ 0.02	No Cq	No Cq
	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	24.54 $\pm$ 0.28	25.59 $\pm$ 0.26	No Cq	No Cq
	<i>L. brogipetersenii</i>	Tarassovi	Perepelitsin	24.36 $\pm$ 0.01	25.97 $\pm$ 0.06	No Cq	No Cq
	<i>L. brogipetersenii</i>	Ballum	Mus 127	24.08 $\pm$ 0.18	25.76 $\pm$ 0.23	No Cq	No Cq
	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945	24.87 $\pm$ 0.10	26.71 $\pm$ 0.29	No Cq	No Cq
	<i>L. noguchii</i>	Panama	CZ 214K	24.82 $\pm$ 0.50	26.34 $\pm$ 0.31	No Cq	No Cq
	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	24.04 $\pm$ 0.23	26.02 $\pm$ 0.02	No Cq	No Cq
	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	24.79 $\pm$ 0.68	26.32 $\pm$ 0.28	No Cq	No Cq
	<i>L. alexanderi</i>	Manhao3	L60	24.01 $\pm$ 0.51	25.33 $\pm$ 0.24	No Cq	No Cq
	<i>L. santarosai</i>	Weaveri	CZ390	24.10 $\pm$ 0.18	26.40 $\pm$ 0.13	No Cq	No Cq
Intermediate	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	BUT 6	24.74 $\pm$ 0.61	No Cq	24.57 $\pm$ 0.33	No Cq
	<i>L. wolffii</i>	Khorat	Khorat-H2	24.56 $\pm$ 0.47	No Cq	24.66 $\pm$ 0.47	No Cq
	<i>L. inadai</i>	Lyme	10	24.79 $\pm$ 0.25	No Cq	24.34 $\pm$ 0.22	No Cq
Non-pathogenic	<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I	24.39 $\pm$ 0.19	No Cq	No Cq	24.24 $\pm$ 0.16
	<i>L. vanthielii</i>	Holland	Waz holland	24.73 $\pm$ 0.24	No Cq	No Cq	24.73 $\pm$ 0.27
Other bacteria	<i>Brachyspira</i> spp.	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Campylobacter</i> spp.	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Enterobacter</i> spp.	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq
	<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	No Cq	No Cq	No Cq	No Cq

Note: ^a specific to *Leptospira* genus, ^b specific to Intermediate group, hyphen (-): no serovar or strain, No Cq: no quantification cycle

Group identification performance

The group identification performance was evaluated on 20 isolated *Leptospira* spp. from cattle, buffalo, rat, and environment which were obtained from blood, urine, kidney, soil, and water. The 20 isolates mentioned above were tested with a multiplex real-time PCR assay in this study. The result showed that the assay was able to distinguish *Leptospira* spp. into their respective groups. The accuracy of identification was confirmed the results from partial *16S rRNA* sequencing. It is apparent from Table 3 that the results from both methods are concordant.

Interestingly, this assay can detect and classify pathogenic and intermediate *Leptospira* spp. apart from 17 serovars of reference *Leptospira* spp. namely, *Leptospira licerasiae* that was isolated from cattle urine (C4-UB10) and *Leptospira kmetyi* that was isolated from soil (5ST3, 2SC1). The results from this study might imply that primer-probe design is appropriate and capable of detecting a broad range of *Leptospira* spp. and discriminating them into their respective groups.

This study lacks the result of inhibitors derived from the field specimen because this assay did not examine specimens directly. However, Pérez et al. (2020) tested multiplex real-time assay on clinical specimens and found that PCR inhibitors were not found in clinical specimens to interfere with multiplex real-time PCR reaction.

Table 3 Results of the multiplex real-time PCR assay and the partial *16S rRNA* sequencing

Specimen names	Types of specimens	Host	Multiplex real-time PCR (+/-)				16S rRNA Sequencing	
			16S rRNA ^a	lipL32	16S rRNA ^b	23S rRNA	Species	Group
C-1UB1	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C1-UB2	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C2-UB1	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C2-UB5	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C2-UB7	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C3-UB16	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C4-UB10	Urine	Cattle	+	-	+	-	<i>L. licerasiae</i>	Intermediate
C6-UB13	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
C7-UB5	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. interrogans</i>	Pathogenic
C7-UB8	Urine	Cattle	+	+	-	-	<i>L. borgpetersenii</i>	Pathogenic
B8-WB1	Blood	Buffalo	+	+	-	-	<i>L. interrogans</i>	Pathogenic
B8-WB2	Blood	Buffalo	+	+	-	-	<i>L. interrogans</i>	Pathogenic
6UR-M2	Urine	Rat	+	+	-	-	<i>L. interrogans</i>	Pathogenic
3KR/K3	Kidney	Rat	+	+	-	-	<i>L. interrogans</i>	Pathogenic
5ST3	Soil	-	+	+	-	-	<i>L. kmetyi</i>	Pathogenic
2SC1	Soil	-	+	+	-	-	<i>L. kmetyi</i>	Pathogenic
6WM2	Water	-	+	-	+	-	<i>L. wolffii</i>	Intermediate
2WL2	Water	-	+	-	+	-	<i>L. inadai</i>	Intermediate
5WT1	Water	-	+	-	-	+	<i>L. biflexa</i>	Non-pathogenic
2WC1	Water	-	+	-	-	+	<i>L. biflexa</i>	Non-pathogenic

Note: ^a specific to *Leptospira* genus, ^b specific to Intermediate group, hyphen (-): unidentified host or no quantification cycle

Conclusion

This study designed 4 primer-probe sets specific to *16S rRNA*, *lipL32*, another region of *16S rRNA*, and *23S rRNA* genes. The result presented optimized condition for multiplex real-time PCR. Multiplex real-time PCR assay can detect *Leptospira* genus and differentiate between 3 groups of *Leptospira* spp., including pathogenic, intermediate, and non-pathogenic groups. The assay provided amplification efficiencies between 90% to 110% and LOD at 100 cells/ml with 100% analytical specificity. The results of the detection of isolated *Leptospira* spp. from clinical and environmental specimens were concordant with *16S rRNA* sequencing results.

Suggestion

For further study, research is needed to validate the assay when detecting a clinical specimen directly and evaluate the effect of different matrix materials. More information regarding these factors would help to determine the diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of the assay. In terms of epidemiology, this method would illustrate the relationship between groups of *Leptospira* spp. and disease severity. Research is also needed to determine leptospirosis prevalence, susceptible hosts, severity, and endemic areas in the future.

Acknowledgement

We would like to express our appreciation to our colleagues from the Leptospirosis center at NIAH who provided insight and expertise that greatly assisted the research. We would also like to extend our thanks to the NIAH's Bacteriology and Mycology section which provided bacteria genetic materials other than *Leptospira* spp. for evaluating the specificity of the multiplex real-time PCR approach.

References

- Adler, B. (2015). History of Leptospirosis and *Leptospira*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 1-9. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1
- Ahmed, A. A., Goris, M. G. A., & Meijer, M. C. (2020). Development of *lipL32* real-time PCR combined with an internal and extraction control for pathogenic *Leptospira* detection. *PLOS ONE*, 15(11), Article e0241584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241584>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bedir, O., Kilic, A., Atabek, E., Kuskucu, A., Turhan, V., & Basustaoglu, A. (2010). Simultaneous Detection and Differentiation of Pathogenic and Nonpathogenic *Leptospira* spp. by Multiplex Real-Time PCR (TaqMan) Assay. *Polish Journal of Microbiology*, 59, 167-173. <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-026>

- Cameron, C. E. (2015). Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 21-41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3
- Čepin, U. (2017, September 15). *Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%*. BioSistemika. <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>
- Chiriboga, J., Barragan, V., Arroyo, G., Sosa, A., Birdsell, D. N., España, K., Mora, A., Espin, E., Mejía, M. E., Morales, M., Pinargote, C., Gonzalez, M., Hartskeerl, R., Keim, P., Bretas, G., Eisenberg, J. N. S., & Trueba, G. (2015). High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), 2141-2147. <https://doi.org/10.3201/eid2112.140659>
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., & Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), Article e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Giry, C., Roquebert, B., Li-Pat-Yuen, G., Gasque, P., & Jaffar-Bandjee, M. C. (2017). Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. *BMC Microbiology*, 17(1), Article 105. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1019-1>
- Krishnan, B. K., & Ganesh, B. (2020). Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance: an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03797-4>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., Turner, D. E., Steigerwalt, A. G., & Mayer, L. W. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 54(1), 45-49. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>
- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., & Levett, P. N. (2006). Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3510-3516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06>
- Murray, G. L. (2013). The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.005>
- Narkkul, U., Thaipadungpanit, J., Srisawat, N., Rudge, J. W., Thongdee, M., Pawarana, R., & Pan-ngum, W. (2021). Human, animal, water source interactions and leptospirosis in Thailand. *Scientific Reports*, 11(1), Article 3215. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82290-5>
- Pérez, L. J., Lanka, S., DeShambo, V. J., Fredrickson, R. L., & Maddox, C. W. (2020). A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious *Leptospira* spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00457>
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Piredda, I., Bertoldi, L., Benvenuto, G., Palmas, B., Pedditzi, A., Pintore, P., & Chisu, V. (2021). First Isolation and Molecular Typing of Pathogenic and Intermediate *Leptospira* Species from Urine of Symptomatic Dogs. *Veterinary Sciences*, 8(12), Article 304. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120304>
- Rogers-Broadway, K.-R., & Karteris, E. (2015). Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1261-1264. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712>
- Romero-Vivas, C., Thiry, D., Rodríguez, V., Calderon, A., Arrieta, G., Máttar, S., Cuello, M., Levett, P., & Falconar, A. (2013). Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 33(Suppl.1), 179-184. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.731>

- Saito, M., Villanueva, S. Y. A. M., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., Ozuru, R., Gloriani, N. G., Yanagihara, Y., & Yoshida, S. (2013). Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 601-609. <https://doi.org/10.1128/AEM.02728-12>
- Selim, A., Elhaig, M., & Gaede, W. (2014). Development of multiplex real-time PCR assay for the detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and *Campylobacter foetus*. *Veterinaria Italiana*, 50, 269-275. <https://doi.org/10.12834/VetIt.222.702.3>
- Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(3), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- Sykes, J. E., Reagan, K. L., Nally, J. E., Galloway, R. L., & Haake, D. A. (2022). Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(4), Article 395. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>
- Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L. D., Limpiboon, R., Hoffmaster, A. R., Day, N. P. J., & Peacock, S. J. (2011). Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting *16S rRNA* and *lipL32* Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *PLOS ONE*, 6(1), Article e16236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M. K. N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), Article e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Waggoner, J. J., Abeynayake, J., Balassiano, I., Lefterova, M., Sahoo, M. K., Liu, Y., Vital-Brazil, J. M., Gresh, L., Balmaseda, A., Harris, E., Banaei, N., & Pinsky, B. A. (2014). Multiplex Nucleic Acid Amplification Test for Diagnosis of Dengue Fever, Malaria, and Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2011-2018. <https://doi.org/doi:10.1128/JCM.00341-14>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), Article 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>