



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARA MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS

---

---

---

**“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM CONTRA *Leptospira interrogans*  
EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL INESPECÍFICO”**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO BIOLÓGO CLÍNICO**

**PRESENTA**

**ROMÁN OBED CRUZ GÓMEZ**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



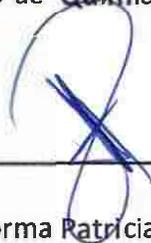
“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

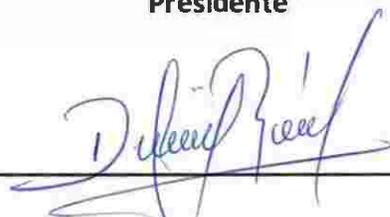
## APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis profesional de **Román Obed Cruz Gómez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Norma Patricia Adán Bante

**Presidente**



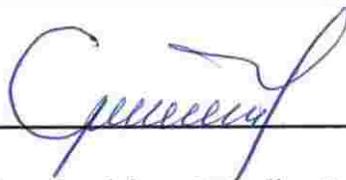
Dr. Danilo Manuel González Román

**Secretario**



M.C. Ramona Icedo García

**Vocal**



Dra. Guadalupe González Ochoa

**Suplente**

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

Se permite y agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de Tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente al autor y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito del manuscrito en cuestión del Director de tesis.

---

**M.C. Ramona Icedo García**

**Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas**

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar agradezco a Dios por ayudarme a cristalizar uno de los sueños más importantes de mi vida como lo es ahora, mi profesión. También por darme la bendición de la salud, la familia, los recursos y por las amistades que han apoyado mi formación académica.*

*De manera especial a la Dra. Norma Patricia Adan Bante por todo el apoyo brindado, el tiempo dedicado a la realización de este proyecto, también por sus consejos, paciencia y profesionalismo.*

*A mis padres de manera importante porque han sido siempre mi apoyo, una motivación y un orgullo para salir adelante. Además agradezco siempre sus oraciones, palabras de ánimo y consejos.*

*A mi hermana Úrsula Cruz Gómez por ser no solo eso, una hermana, sino por acompañarme a lo largo de mi realización profesional y darme su destacado apoyo, sincero e incondicional.*

*Por último y no menos importante, a mi querida UNIVERSIDAD DE SONORA que a través de los maestros, edificios y aulas han contribuido a dar vida a un nuevo profesional. ¡Siempre Bueno!*

## DEDICATORIAS

*Este trabajo des pués de dedicarlo a Dios quien es el primero que me ha permitido concretarlo, lo dedico a mis padres Román Cruz Hipólito y Obdulía Gómez Guillén porque sin ellos de principio a fin no hubiese sido posible este logro. También lo dedico con cariño a mis hermanos Melisa Lorena, Úrsula, y Oscar ¡Gracias familia!*

## ÍNDICE

Página

<b>APROBACIÓN</b> .....	<b>I</b>
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>X</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LEPTOSPIROSIS</b>	
<i>Leptospira interrogans</i> .....	<b>1</b>
Características Estructurales y Antigénicas.....	<b>3</b>
Síndrome Febril Inespecífico.....	<b>4</b>
Serovares de Importancia Clínica en México.....	<b>6</b>
Zoonosis y Leptospirosis.....	<b>6</b>

	Pagina
Reservorios y Mecanismos de Transmisión.....	6
Respuesta Inmunológica.....	10
Manifestaciones Clínicas de Leptospirosis.....	10
Datos de Laboratorio Clínico.....	12
Diagnóstico Diferencial.....	12
Tratamiento.....	13
Epidemiología.....	13
profilaxis.....	16
 <b>MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE <i>Leptospira interrogans</i></b>	
Cultivo.....	19
Microscopía de Campo Oscuro.....	21
Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA).....	21
Reacciones en Cadena de la polimerasa (PCR).....	23
Southern Blot.....	23
Microaglutinación en Placa (MAT).....	24
Características de la Muestra.....	25
Recolección de la Muestra.....	26
Antígenos.....	26

	Pagina
Inmunofluorescencia.....	27
Tipos de Fluorocromos y Aplicaciones.....	27
Métodos de Inmunofluorescencia Directa e Indirecta.....	28
Aplicaciones de la Inmunofluorescencia.....	29
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Población de Estudio y Tamaño de Muestra.....	32
Criterios de Inclusión.....	32
Criterios de Exclusión.....	32
Recolección y Conservación de la Muestras.....	32
Valoración Clínica.....	34
Detección de Anticuerpos IgM Contra <i>Leptospira interrogans</i> .....	34
Preparación de Muestras y Reactivos.....	36
 <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Análisis de Resultados y Discusión.....	40
Conclusiones.....	44
Recomendaciones.....	44
Fuentes Bibliográficas.....	45
Anexos.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Modelo de la arquitectura de membrana de <i>Leptospira</i> .....	5
Figura 2. Estados con casos confirmados de leptospirosis de 2000-2010.....	17
Figura 3. Microscopía de interferencia de <i>Leptospira pomona</i> proveniente de un cultivo.....	20
Figura 4. Principio del microscopio de campo oscuro.....	22
Figura 5. Principio de la inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI).....	30
Figura 6. Jurisdicción Sanitaria No. V del estado de Sonora .....	33
Figura 7. Microscopio de fluorescencia marca Leica.....	35
Figura 8. Barrido del medio de montaje y observación en el microscopio.....	38
Figura 9. Interpretación de controles.....	39
Figura 10. Síntomas clínicos presentados por los pacientes.....	42

## LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. <i>Leptospira</i> , especies patógenas y saprófitas.....	2
Tabla 2. Principales serovares de importancia clínica en México.....	7
Tabla 3. Reservorios y su relación con los serovares patógenos.....	8
Tabla 4. Manifestaciones clínicas de las etapas de leptospirosis.....	11
Tabla 5. Tratamiento para leptospirosis.....	14
Tabla 7. Aplicaciones diagnósticas de la inmunofluorescencia directa e indirecta.....	31
Tabla 8. Muestras analizadas por municipios.....	41

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar anticuerpos IgM contra *Leptospira interrogans* en pacientes con síndrome febril inespecífico.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Detectar la presencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira interrogans* mediante inmunofluorescencia indirecta.

## HIPÓTESIS

La detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira interrogans* en muestras de pacientes con síndrome febril inespecífico permitirá identificar casos activos de leptospirosis en la población de estudio.

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad emergente a nivel mundial. En el sur del estado de Sonora no se cuenta con suficiente información de la patología, por lo que continúa siendo una enfermedad poco estudiada y por lo tanto, subdiagnosticada. En el presente estudio se hizo la búsqueda de anticuerpos de tipo IgM contra *Leptospira interrogans* mediante la técnica inmunofluorescencia indirecta. Se analizaron 80 muestras de pacientes procedentes de los municipios de Navojoa, Huatabampo, Etchojoa y Álamos; municipios perteneciente a la Jurisdicción Sanitaria V. Los resultados fueron 41 (51.25%) casos positivos y 39 (48.75%) resultaron negativos. La seropositividad en mujeres fue de 26 (67.5%) y 13 (32.5%) en hombres, con mayor número de casos en el municipio de Navojoa. La detección de anticuerpos IgM manifiesta la existencia de infección activa por *Leptospira interrogans*, lo cual indica que es necesario ampliar la búsqueda e investigación sobre esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis, es una enfermedad zoonótica, en su forma aguda conocida como síndrome de Weil y tiene una distribución mundial, siendo documentado en países con clima tropical y relativa humedad. El agente etiológico de la leptospirosis es la bacteria del género *Leptospira* y la especie *Interrogans*; como reservorio se han descrito a roedores, animales domésticos y mamíferos salvajes. El hombre se infecta de manera accidental, presenta cuadros clínicos de muy leves a mortales que pueden ser desde una fiebre recurrente hasta falla renal aguda, meningitis aséptica, hemorragia pulmonar, arritmias cardíacas y colapso circulatorio.

Existen pruebas serológicas como ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima) o radioinmunoensayo que pueden detectar anticuerpos o la parte antigénica de *Leptospira Interrogans*, sin embargo no brindan alta sensibilidad y suelen presentar reacción cruzada con la fracción antigénica de otras bacterias. La microaglutinación en placa (MAT) es reconocida como la prueba de oro por la Organización mundial de la salud con ella se determina el serogrupo y serovar, sin embargo, precisa de laboratorios con nivel de bioseguridad dos. Así mismo, se emplean otras pruebas confirmatorias basadas en la biología molecular como Southern Blot, Inmuno blot y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo, no están disponibles al alcance de los laboratorios clínicos convencionales, por su alto costo.

La detección de anticuerpos a través de inmunofluorescencia indirecta es una prueba que ofrece una elevada sensibilidad diagnóstica que permite determinar la presencia de *Leptospira interrogans* a través del hallazgo de anticuerpos antileptospira.

El diagnóstico de la leptospirosis sigue siendo complejo, debido a su polimorfismo clínico siendo subdiagnosticada, además los estudios de laboratorio clínico rutinario no permiten identificar a este agente etiológico, siendo necesario, el empleo de técnicas más especializadas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), siendo un método útil en el apoyo diagnóstico de leptospirosis.

## LEPTOSPIROSIS

### *Leptospira interrogans*

El género *Leptospira* (L.) pertenece a la familia *Leptospiraceae* y se divide en dos especies, *L. interrogans* y *L. biflexa*; la primera comprende las cepas patógenas y la segunda las saprófitas o ambientales. Ambas especies incluyen numerosos serovares definidos por aglutinación luego de la adsorción cruzada con antígenos homólogos. Se han identificado más de 60 serovares de *L. biflexa* y más de 200 de *L. interrogans* (Roca., 2006).

Ambas especies presentan dificultades para su tinción, sin embargo, pueden teñirse débilmente como Gram negativas, tienen forma helicoidal alargada, poseen tamaño de 6-20 µm de longitud x 0,1 micras de ancho. Son aerobias estrictas, de crecimiento lento, y presentan movilidad por la presencia de flagelos periplásmicos (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2013). Así mismo, presenta una doble membrana, la interna que es la citoplasmática y la exterior conformada por peptidoglicano la cual posee un lipopolisacárido similar a las bacterias Gram negativas pero es de menor actividad endotóxica. Por otro lado, las espiroquetas poseen actividad citotóxica tales como; fibrolisinas, lipasa y hemolisinas así como las endotoxinas hialuronidasa y catalasa quienes en conjunto, juegan un papel importante en la patogenia de ésta bacteria (Peña, 2012; Pulido y cols, 2014). La Tabla 1 muestra la clasificación de las especies patógenas y saprofitas.

La *Leptospira interrogans*, es la única especie patógena del género bacteriano *Leptospira*, la estructura del ADN permite clasificarlos en 15 genomoespecies, y su composición antigénica lo clasifica en 25 serogrupos y unos 200 serotipos, siendo estas de interés clínico y epidemiológico. Entre las serovariedades patógenas más importantes se encuentran icterohemorrhagie, canicola, pomona, grippotyphosa y australis (Carrizo y cols, 2009).

Tabla 1. *Leptospira*, especies patógenas y saprófitas (Céspedes, 2005).

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
<b>Leptospiras patógenas</b>			
<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Copenhageni</i>	M20
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>lai</i>	Lai
	<i>Canicola</i>	<i>panicola</i>	Hond Utrecht IV
	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
	<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
	<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
	<i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
	<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	Jez Bratislava
	<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Van Tienen
	<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
	<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>	3522C
	<i>Pomona</i>	<i>Mozdok</i>	5621
	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	Mus 127
	<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>	Castellon 3
	<i>Panama</i>	<i>panamá</i>	CZ 214K
	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Perepicilin
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe</i>	M84	
<i>Mini</i>	<i>Georgia</i>	LT117	
<i>L. alexanderi</i>	<i>Manhao</i>	<i>manhao3</i>	L60
<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>	<i>hurstbridge</i>	BUT 6
<i>L. inadai</i>	<i>Lyme</i>	<i>lyme</i>	10
<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>L. meyeri</i>	<i>Semaranga</i>	<i>semaranga</i>	Velrad Semarang 173
<i>L. bargpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	Veldrat Bat 46
<i>L. weilii</i>	<i>Celledani</i>	<i>celledani</i>	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>fortbragg</i>	Fort Bragg
<i>L. santarosai</i>	<i>Bataviae</i>	<i>brasilienses</i>	An 776
<i>Genomospecies 1</i>	<i>Ranarum</i>	<i>pingchang</i>	80-412
<i>Genomospecies 4</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>hualin</i>	LT 11-33
<i>Genomospecies 5</i>	<i>Semaranga</i>	<i>saopaulo</i>	Saopaulo
<b>Leptospiras saprófita</b>			
<i>Genomospecies 3</i>	<i>Holland</i>	<i>halland</i>	Waz Holland (P438)
<i>L. biflexa</i>	<i>Semaranga</i>	<i>patac</i>	Patac I
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	<i>codice</i>	CDC

*Leptospira interrogans* tiende a formar un gancho aerobio que se ha diferenciado de otras espiroquetas patógenas y se puede cultivar en medios artificiales. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y el tiempo para obtener una nueva generación es de 7 a 10 días para nuevas colonias aisladas, pero son difíciles de recuperar mediante cultivos in vitro. El genoma de las leptospiras consiste en dos cromosomas circulares y el genoma es largo comparado con el de otras espiroquetas como *Treponema spp* y *Borrelia spp*, lo cual indica la habilidad de vivir en diversos ambientes: hospederos animales y libremente en el medio ambiente (Velázquez, 2014).

#### **Características Estructurales y Antigénicas**

Se ha observado que *Leptospira* posee varios antígenos expresados en su superficie, predominantemente lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de la membrana externa (OMPs). La gran diversidad de serovariedades ha sido atribuida a las diferencias en la estructura y composición de los LPS. Muchos trabajos se han centrado en el papel que cumplen los LPS en la inmunidad y las bases genéticas de su biosíntesis. Al respecto, se demostró que preparaciones de LPS otorgan inmunidad, pero ésta es específica para cada serovariedad. Debido a ello, las investigaciones en antígenos han conducido a las OMPs, que son capaces de estimular una respuesta inmune heteróloga. Se identificaron proteínas como OmpL1 y LipL41, las que en términos antigénicos se encuentran conservadas entre las distintas especies patógenas (Brihuega y cols, 2009; Evangelista y Coburn, 2010).

La mayoría de las investigaciones relacionadas con los antígenos de *Leptospira*, se basan en los lipopolisacáridos, debido a que las variaciones en las cadenas laterales de carbohidratos son las responsables de la diversidad antigénica observada entre las diferentes cepas de *Leptospira*. Las proteínas de membrana externa desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Entre las proteínas aisladas de serovares de *Leptospira interrogans* se encuentran: LipL32, LipL21, LipL45, LipL31, OmpL1, Flagelina/FlaB1, LipL36, LipL41, LipL71 y LigA. Dentro de éstas, las proteínas

LipL31 y OmpL1 son candidatas para la producción de inmunógenos. LipL32 constituye el antígeno proteico más abundante en la membrana externa y el de mayor relevancia en la respuesta inmune frente a la infección natural, tanto en fase aguda como en convalecencia y ha sido vinculada directamente con la inducción de daño a nivel de los túbulos renales (Baquero y cols, 2010; Batista y cols, 2010).

GroEL es una proteína inmunoreactiva dominante, que se encuentra en la fracción soluble de la célula. Esta proteína ha sido reportada en especies patógenas y saprofitas de *Leptospira*. Se han identificado dos antígenos, p62 y p76, que actúan en sinergismo con GroEL y DnaK respectivamente. La expresión de las proteínas heat shock, GroEL y DnaK, se regula a temperaturas elevadas en los hospederos mamíferos y se reconocen en el suero de pacientes en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. Se ha reportado que la mayor parte de la respuesta inmune a enfermedades infecciosas corresponde a proteínas de tipo heat shock. El determinante antigénico dominante de GroEL es una región de veinte aminoácidos, ver Figura 1. La proteína GroEL puede tener reactividad cruzada con proteínas de otras bacterias, lo que limita la posibilidad de utilizarla como marcador específico de serorreactividad a especies de *Leptospira* (Guerreiro y cols, 2001).

#### **Síndrome Febril Inespecífico**

El término síndrome febril inespecífico o fiebre de origen desconocido fue definido por vez primera en 1930 por Alt y Barker, 30 años después en 1961 Petersdorf y Beeson definieron los primeros criterios diagnósticos como: una temperatura superior a 38.3°C medida en varias ocasiones, con una duración de más de 3 semanas. Las causas del síndrome febril inespecífico son múltiples y variadas, la literatura médica muestra aproximadamente 200 causas distintas asociadas etiológicamente a este síndrome y se agrupan en tres categorías: enfermedades infecciosas, neoplásicas y autoinmunes (Fauci y cols, 2008).

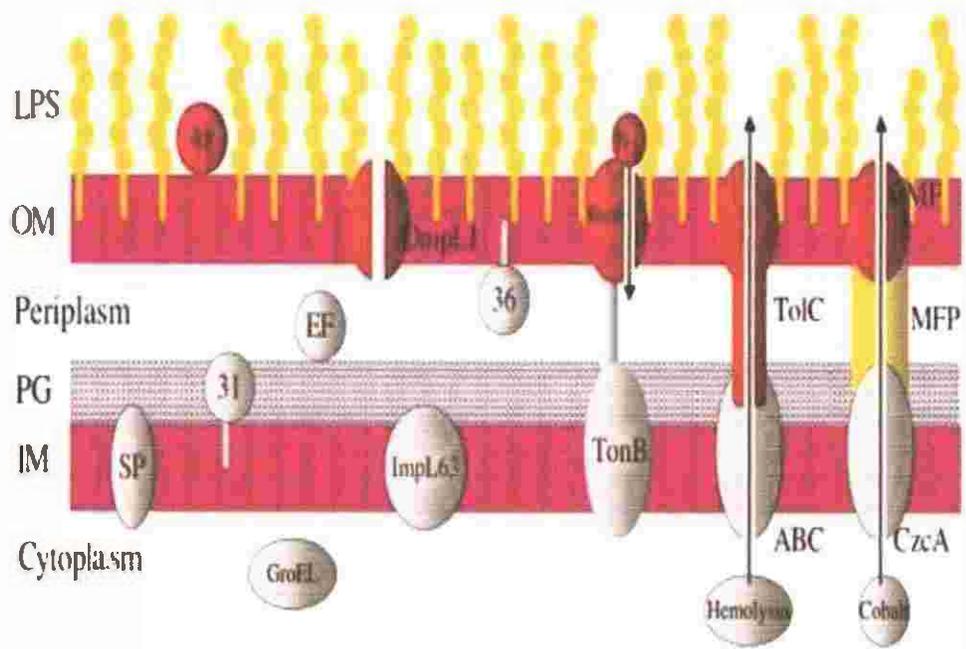


Figura 1. Modelo de la arquitectura de membrana de *Leptospira*. (Verjovski y cols, 2004).

### **Serovares de Importancia Clínica en México**

Aunque en los últimos años han sido introducidos una gran variedad de métodos para el análisis genético, tipaje y clasificación de cepas de *Leptospira*, estos no están al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos de los países en desarrollo debido a su alto costo. La clasificación serológica mediante la técnica de microaglutinación con el empleo de antisueros policlonales de conejo sigue siendo el método más utilizado a pesar de ser laborioso y limitado para la clasificación de serovares (González, 2002).

Valencia y colaboradores reportaron un estudio realizado en México en el estado de Tabasco, los cuales, mostraron la presencia de *Leptospira interrogans* e identificaron los serovares responsable causantes de la enfermedad y las defunciones presentadas. En la Tabla 2 se muestra los serovares identificados en este estudio. Así mismo, se incluye los serovares *pyrogenes* y *cynopteri* reportados por otros investigadores los cuales mostraron similar comportamiento (Romero y cols, 2007; Valencia y cols, 2014).

### **Zoonosis y Leptospirosis**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), una zoonosis se define como la transmisión de cualquier enfermedad o infección de animales vertebrados a humanos. En este sentido la leptospirosis además de ser considerada una enfermedad zoonótica también es una enfermedad tanto endémica como epidémica y reemergente que puede simular un cuadro clínico similar a otras enfermedades tropicales como el dengue, fiebre, tifus, entre otras (García y cols, 2013).

### **Reservorios y Mecanismos de Transmisión**

Un vector se define como el medio para transmitir una enfermedad, el cual está relacionado con agentes bióticos y abióticos. Para el caso de *Leptospira interrogans* los vectores de transmisión son roedores, caninos, porcinos, bovinos, ovinos, equinos e incluso murciélagos, con quienes el ser humano tiene contacto directo; estos pueden actuar como portadores asintomáticos o huésped intermediario y como consecuencia se puede presentar diferentes serovares de acuerdo al reservorio, observar Tabla 3,

Tabla 2. Principales serovares de importancia clínica en México (González y cols, 2002; Valencia y cols, 2014).

<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa de referencia</b>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	<i>hordjo</i>	<i>Projitno</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	<i>Salinem</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Canícola</i>	<i>canicola</i>	<i>hond Utrech</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>	<i>3522C</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	<i>AkiyamiA</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>RGA</i>
<i>L. Interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	<i>Pomona</i>

Tabla 3. Reservorios y su relación con los serovares patógenos (Céspedes, 2005)

Reservorio	Serovar
Cerdo	<i>pomona, torassovi</i>
Vacuno	<i>hardjo, pamana, grippotyphasa</i>
Caballo	<i>bratislava</i>
Perro	<i>canicola, cynopteri</i>
Oveja	<i>hardja</i>
Rata	<i>icterahaemarragiae, copenhageni</i>
Raton	<i>ballum, arborea, bim</i>
Marsupiales	<i>grippotyphasa</i>
Murciélago	<i>cynopteri, walffi</i>

Donde de acuerdo a diversas investigaciones los principales reservorios reportados son los caninos y roedores (Romero y cols, 2010; Pulido y cols, 2014).

Uno de los mecanismos de transmisión de *Leptospira interrogans* es a través de la orina de animales infectados. Este agente se hospeda en los túbulos renales de los portadores, colonizando persistentemente este sitio para luego ser eliminados por la orina (Luna y cols, 2008; Álvarez y cols, 2011). Este fluido biológico contamina el agua de ríos, lagos y demás fuentes hídricas que son utilizadas para uso comercial, agrícola, ganadero o para el consumo humano y de animales, lo que favorece una exposición directa o indirecta con el humano y pueden entrar al cuerpo a través de cortaduras o abrasiones en la piel, por las membranas mucosas intactas (nariz, boca, ojos) y, probablemente, a través de piel que ha permanecido por mucho tiempo sumergida en el agua; así mismo, la orina de un paciente con leptospirosis debe ser considerada infecciosa. (Jobbins y cols, 2014; Pulido y cols, 2014; Valle y cols, 2014).

Otras formas de transmisión de la infección son la manipulación de tejidos de animales infectados y la ingestión de alimentos o agua contaminada. La infección de humano a humano ocurre raramente por relaciones sexuales, por vía transplacentaria de la madre al feto y por la leche materna. Además la transmisión de la bacteria se ha asociado con actividades de tipo deportivas como la canoa, kayak, rafting, vadear y nadar en aguas contaminadas también con determinadas profesiones y oficios como veterinarios, agricultores y empleados de mataderos o rastros sugiriendo que estas actividades aumentan el riesgo de contraer leptospirosis con respecto a la población en general, aunque la inhalación de partículas de aerosol también ha sido implicada (Manual de Procedimientos y Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis, 2012;Roca, 2006; Enfermedades infecciosas: Leptospirosis, Guía para el equipo de salud, 2014).

### **Respuesta Inmunológica**

Los seres humanos reaccionan a una infección por *Leptospira* con la producción de anticuerpos específicos. La seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad pero algunas veces solo después de 10 días o incluso más. Los anticuerpos IgM aparecen, generalmente, más temprano que los anticuerpos de clase IgG y permanecen usualmente detectables por meses o aún años aunque a bajos títulos. La detección de anticuerpos IgG es más variable; algunas veces pueden no ser detectables en suero pero ocasionalmente pueden persistir por varios años. Los anticuerpos son dirigidos contra: Antígenos comunes (llamados antígenos género específicos) que son compartidos por todas las leptospiras tanto patógenas como saprofitas; Antígenos serovar específicos y serogrupos específicos. Los pacientes con leptospirosis pueden producir anticuerpos que reaccionan con varios serovares (Romero E, Claudia M (2008)).

### **Manifestaciones Clínicas de Leptospirosis**

El tiempo entre la exposición a la fuente de contaminación y el comienzo de síntomas es de dos días a cuatro semanas. Usualmente los pacientes presentan fiebre, cefalea, mialgias, hemorragia conjuntival o conjuntivitis, postración, erupción cutánea, artralgias, vómito, náusea, dolor retro ocular, escalofríos, fotofobia, secreción conjuntival, dolor en pantorrillas, diarrea, dolor abdominal y dolor de espalda. Además se pueden presentar manifestaciones que sugieran progresión de la enfermedad con compromiso de órganos o sistemas, como: ictericia, oliguria, anuria, hemorragias en piel, mucosas y tracto gastrointestinal, irritación meníngea, confusión, psicosis, delirio, arritmias, insuficiencia cardíaca, tos, hemoptisis, falla respiratoria. Si la enfermedad no leptospirosis., 2014), según las manifestaciones clínicas presentadas por la leptospirosis, se agrupan en dos fases: leptospirosis aguda o leptospirémica y la autoinmune o leptospiúrica como se observa en la Tabla 4 (Levinson, 2004; Vanasco y cols, 2012).

Tabla 4. Manifestaciones clínicas de las etapas de leptospirosis (Roca, 2006).

Fase	Leptospirémica	Leptospíurica
Leptospirosis	Fiebre, cefalea, dolor difuso, conjuntivitis	Muy variable, en muchos casos asintomática, en algunos casos meningitis o afección ocular
Leptospirosis grave	Fiebre, cefalea, dolor difuso, conjuntivitis.	Ictericia, insuficiencia renal, diátesis hemorrágica, rabdomiólisis.

es tratada, el paciente puede desarrollar daño hepático, esplenomegalia, meningitis y dificultad respiratoria. En algunas ocasiones puede evolucionar hasta causar la muerte (Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública protocolo de vigilancia en salud pública:

#### **Datos de Laboratorio Clínico**

En los análisis de sangre suele aparecer elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG), leucocitosis con desviación izquierda (células inmaduras) y trombocitopenia ligera. En cuadros prolongados puede aparecer también anemia. La bilirrubina, las fosfatasas alcalinas y la gamma-glutamil-transpeptidasa suelen estar claramente elevadas, mientras que las transaminasas sólo suelen elevarse ligeramente. En los casos más graves todas estas alteraciones analíticas son más marcadas, y también pueden aparecer trastornos de la coagulación. Son prácticamente constantes las alteraciones de la función renal, entre las que figuran la proteinuria y la aparición de leucocitos, hematíes, y cilindros hialinos y granulosos en el sedimento urinario. En los casos graves también se produce elevación de los niveles de creatinina y urea en la sangre. Es igualmente común la elevación de los niveles de las enzimas musculares, como la creatín-fosfocinasa. En los pacientes con meningitis existe pleocitosis, que inicialmente es polimorfonuclear, pero posteriormente se transforma en mononuclear; la proteinorraquia también suele aumentar, pero la glucorraquia suele ser normal (Roca, 2006; Gallegos y Leandro, 2010).

#### **Diagnóstico Diferencial**

Debe realizarse con: influenza; fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por dengue, infecciones por hantavirus; incluyendo el síndrome pulmonar por hantavirus u otros síndromes de dificultad respiratoria, rickettsiosis, borreliosis, meningitis aséptica, fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas, y hepatitis virales (Manual de Procedimientos y Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica, 2012).

## Tratamiento

Leptospiras son sensibles a una variedad de agentes antimicrobianos incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y tetraciclinas. Los antibióticos más recomendados son de la familia de los beta lactámicos como penicilina, tetraciclina y doxiciclina suele ser eficaz si se administran en los primeros días de la fase bacteriémica, disminuye la gravedad y la afectación hepatorenal; incluso cuando se administra más tarde con las lesiones ya establecidas, puede ser eficaz, probablemente debido a la base inmunopatológica del mecanismo lesional. En la Tabla 5 se resume el manejo farmacológico en función de la gravedad del cuadro clínico (Carrada, 2005; Maris y Rago, 2011).

Las tetraciclinas ejercen un efecto bacteriostático, inhibiendo reversiblemente la síntesis proteica en células procariontas que contienen ribosomas 70S. Se fijan con gran afinidad a la subunidad 30S y bloquean la unión del aminoacil-ARNt en el sitio aceptor (locus A) en el complejo formado por el ARNm y el ribosoma. Ello impide el agregado de aminoácidos en la cadena peptídica en formación (síntesis proteica). Las cefalosporinas entre otros beta lactámicos impiden la formación de la pared celular, específicamente inhibe la conexión o ensamblaje de las cadenas de peptidoglicanos (Gram positivas). La bencilpenicilinas es otro betalactámico el referente de esta categoría y presenta un mecanismo de acción bactericida en fase de división, por inhibición de la síntesis de los mucopéptidos de la membrana de la bacteria. Las bencilpenicilinas inhiben el paso final de la unión de peptidoglicano mediante su unión a transpeptidasas, proteínas fijadoras de penicilinas, que se encuentran en la superficie interior de la cubierta celular bacteriana, inactivándolas (Velázquez y cols, 2008).

## Epidemiología

La leptospirosis es una de las zoonosis más difundidas en el mundo y de gran impacto en salud pública. Su distribución es mundial, pero se presenta con mayor frecuencia e

Tabla 5. Tratamiento para leptospirosis (Modificado de Guidugli F (Guidugli, Castro, & Atallah, 2009) (Guidugli, Castro, & Atallah, 2009)y cols, 2009).

Fase	Antibiótico	Dosis	Frecuencia
Quimioprofilaxis	Doxiciclina	200mg	1 vez por semana
Forma leve	Doxiciclina	200 mg	Oral, diario
	Amoxicilina	500 mg	Cada 6 horas
	Ampicilina	500-750mg	Cada 6 horas
Forma moderada o grave	Penicilina G	5 millones	U/día, cada 6 horas
	Ampicilina	0.5-1gr	Cada 6 horas
Los casos graves suelen ser tratados con altas dosis de bencilpenicilinas.			

los trópicos debido a factores ambientales, climáticos y sociales que favorecen su transmisión. En la actualidad la epidemiología de la enfermedad ha cambiado, especialmente en ambientes ocupacionales y rurales en donde los riesgos asociados han disminuido, pero se ha incrementado el reporte de brotes en zonas urbanas y en poblaciones con diferentes niveles de riesgo, siendo considerada como una de las enfermedades infecciosas reemergentes. Esta enfermedad afecta la producción animal y la salud del humano por lo que tiene un impacto importante a nivel sanitario (Romero, 2010; Rodríguez e Irlene, 2011). El número de casos que ocurre mundialmente no es conocido con precisión. De acuerdo con los reportes disponibles, la incidencia, la incidencia anual varía dentro de un rango desde aproximadamente 1 por cada 100 000 en climas templados hasta 100 por cada 100 000 habitantes en climas húmedos tropicales y de 300,000 a 500,000 nuevos casos en Latinoamérica incluido México (SSA, 2012; Sánchez, 2015).

En México, los primeros estudios fueron realizados por Noguchi y Klieger en Yucatán, en 1919. Posteriormente, en 1921 Pérez Grovas aisló, en Veracruz, la *Leptospira* en pacientes considerados como casos de fiebre amarilla. En 1928, también en Veracruz, Castañeda cultivó las *Leptospiras* en *Rattus norvegicus*. Gastélum (1931) en Mazatlán, refirió la existencia de leptospirosis en los litorales mexicanos. Seis años después, Bustamante describió tres casos de enfermedad de Weil, uno de ellos confirmado serológicamente por Bauer, en Nueva York. Varela y colaboradores, a partir de 1930 y hasta 1969, realizaron varios trabajos que abarcan estudios en humanos, así como en algunas especies animales en diferentes partes de la República Mexicana. En Jalisco, la primera referencia data de 1961, con una tasa de 34.9% en la población de La Manzanilla. Sin embargo, este resultado no fue ratificado en la encuesta nacional de 1965. En Chiapas, en 1975, el Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste reportó una seropositividad de 14.5% en humanos. En Yucatán se reportó una seropositividad en humanos similar (14.1%) a la reportada en Chiapas, con predominio en el área rural

(18.9%) con respecto a la urbana (8%). En 1985, Velasco Castrejón inició el estudio clínico de la fase crónica de la leptospirosis, muy común en México, al arribar al Instituto de Seguridad del Estado de Tabasco (Zúñiga, 2013).

En 1997, se reportó la coexistencia de leptospirosis y dengue en tres casos estudiados en Campeche, Colima, Tabasco y Distrito Federal. En 1998, en Chiapas, durante la depresión tropical número 10, se presentaron casos de síndrome febril que inicialmente fueron sospechosos para dengue. Posteriormente, en 14.8% de los enfermos se aisló la *Leptospira* de las serovariedades *icteroheorrhagiae* y *conícala*. La leptospirosis no tenía reporte en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en México. Fue hasta el año 2000 cuando se inició su registro de manera continua en el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedad sujetos a Vigilancia Epidemiológica, ver Figura 2 (Carrada y cols, 2002-2005; Lozano, 2013).

El primer estudio de leptospirosis en Sonora se realizó en 1998 en ganado bovino, las serovariedades con mayor prevalencia fueron *hordjo*, *wolffi* y *tarossovi*. Los Estados que presentaron una incidencia mayor fueron Hidalgo, Sinaloa, Veracruz, Tabasco, Sonora y Yucatán, que reportan entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100 000 habitantes, el grupo de edad más afectado fue el de 50-59 años, predominando el sexo masculino. En este mismo contexto reportó (Gaz y Anduro, 2013), la presencia de *Leptospira* en el sur del estado de Sonora (Lugo y cols, 2015).

#### **Profilaxis**

En nuestro país, existe la NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano. La leptospirosis es una enfermedad de notificación semanal, a través del formato denominado "Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades" y, en caso de brotes, se debe notificar de manera inmediata en los formatos que establece el órgano normativo nacional (NOM-017-SSA2-1994). Ambas normas la NOM- 017-SSA2-1994, *para la vigilancia*



Figura 2. Estados con casos confirmados de Leptospirosis de 2000-2010 (Zúñiga, 2012).

*epidemiológica* y la NOM-029-SSA2-1999, *para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano* tienen como objeto establecer las medidas preventivas, de control y de vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en el humano. Dichas normas establecen que la prevención de la leptospirosis en la población general se lleva a cabo mediante actividades de promoción de la salud, saneamiento básico, protección de grupos en riesgo, así como de animales domésticos y de interés económico (Zúñiga, 2013).

La educación a la población es vital por lo que se debe educar sobre la enfermedad, su distribución, formas de transmisión, manifestaciones clínicas, reservorios y sobre todo de acciones preventivas como:

- ✓ Mantenimiento de áreas domiciliarias libres de escombros que sirvan de abrigo a los roedores
- ✓ Limpieza y desinfección de áreas posiblemente contaminadas con orina de roedores (suelo, techos)
- ✓ Evitar caminar descalzo en la vivienda o sus alrededores
- ✓ Evitar la contaminación de agua de consumo y alimentos, lavarlos antes de su uso.
- ✓ Mejorar los hábitos de higiene y manipulación de alimentos. adecuado almacenamiento de los mismos.
- ✓ Desinfección de las latas de alimentos.
- ✓ Si no se dispone de agua potable, educar para realizar desinfección física o química.
- ✓ Posterior a períodos de inundación o lluvias, se debe limpiar y desinfectar el agua o lodo residual que se encuentre en las viviendas (OMS., 2008; Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, 2014).

## Métodos Diagnósticos de *Leptospira interrogans*

### Cultivo

Las muestras para cultivo deben ser múltiples y tomadas según el estadio de la enfermedad; en la primera semana, de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR), y de la segunda semana en adelante, de orina. La *Leptospira* puede permanecer en la orina hasta 11 meses después de iniciada la enfermedad. Las leptospiras se cultivan en medios artificiales constituidos por una solución de sales minerales, peptona, agar, aminoácidos además se añade suero de conejo al 10% y ácidos grasos de cadena larga como principal requerimiento nutritivo del microorganismo. La membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina puede también ser utilizada para el cultivo de leptospiras; dentro de estos medios podemos mencionar el medio Stuart (Dammert, 2005).

Otro medio útil para el cultivo de *Leptospira* es el medio de Ellinghausen, McCulloch, Harris y Johnson o EMJH el cual contiene albúmina bovina al 1% con tween 80, necesitando un pH óptimo de 7.4 para el crecimiento. La incubación se realiza a 28-30 °C, el tiempo de duplicación es lenta, aproximadamente de 12 a 24 horas. Debido a su lento desarrollo, sólo se observa crecimiento después de transcurrida una semana; sin embargo, no debe considerarse el cultivo como negativo sino hasta transcurrido un mes. El crecimiento en medios líquidos se manifiesta por enturbiamiento; y en los medios semisólidos, el desarrollo se inicia a 1-2 cm de la superficie, las colonias crecen mejor en aerobiosis donde desarrollan colonias redondas de 1-3 mm de diámetro en 6-10 días, ver Figura 3 (Laguna y cols, 2000; Carrada., 2005; Dammert, 2005).

El medio de cultivo Fletcher es otra alternativa para la recuperación de *Leptospira*, a este medio semisólido se le adiciona tween 80-albúmina de 1-3 gotas en 5 ml de medio y se incuba a una temperatura de entre 28 y 30°C en la oscuridad durante 5 a 6 semanas (González y Cols., 2006). En los medios de crecimiento semisólidos el crecimiento de leptospiras se aprecia la formación de un anillo de turbidez debajo de la



Figura 3. Microscopia de interferencia de *Leptospira pomona* proveniente de un cultivo.  
(Carrada-Bravo, 2005).

superficie, de unos 0.5 a 1 cm de espesor, que aparece de 6 a 14 días posteriores a la inoculación. La adición de 5-fluoruracilo al medio evita la contaminación bacteriana y permite mejores aislamientos (García y Cols, 2012).

### **Microscopía de Campo Oscuro**

En la microscopía de campo oscuro, una luz oblicua es emitida hacia las leptospiras sobre el portaobjeto mediante el uso de un condensador especial, mientras la luz central es interrumpida, ver Figura 4. Las leptospiras se destacan como hebras de plata sobre el fondo oscuro. Es esencial usar un microscopio de campo oscuro de buena calidad (OMS, 2008).

El uso del microscopio para detectar las leptospiras en fluidos o tejidos biológicos (sangre, orina, LCR) podría ofrecer un diagnóstico rápido. Sin embargo en las muestras de sangre obtenidas durante la fase leptospirémica la concentración de microorganismos es tan baja, que dificulta su detección. Además, el examen directo de muestras clínicas o sus concentrados en el microscopio de campo oscuro y los métodos de tinción convencionales son poco sensibles, debido a la interferencia de artefactos “pseudoespiroquetas” que confunden aún al personal especializado. Por esta razón el diagnóstico microscópico debe confirmarse mediante cultivo y serología (Céspedes, 2005; WHO, 2003).

### **Inmunoabsorbancia Ligada a Enzima (ELISA)**

Como prueba preliminar para el hombre y los animales, se puede utilizar la prueba en placas con antígenos inactivados, que es rápida y fácil de realizar. En particular, esta prueba es muy útil para diagnosticar la enfermedad en rebaños o en la medicina veterinaria. Como prueba género específica se ha empleado la de aglutinación en placa, sirviéndose como antígeno de una cepa patoc de leptospiras saprófitas (*L. biflexa*) para determinar si el paciente sufre de leptospirosis, la reacción a esta prueba es marcada en el periodo agudo de la leptospirosis y luego se negativiza rápidamente. Se pueden determinar clases de inmunoglobulinas IgM e IgG; la IgM aparece después de la

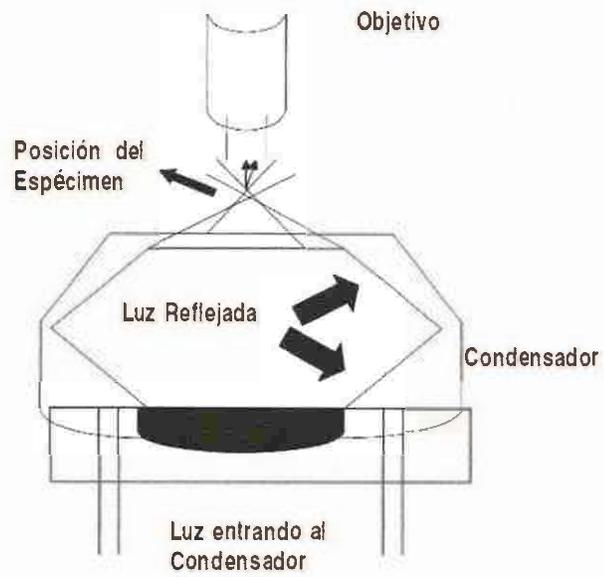


Figura 4. Principio del microscopio de campo oscuro.

primera semana de la enfermedad y la IgG después de varias semanas. La prueba solo detecta anticuerpos género específicos y no es apropiada para la identificación del serogrupo o serovar. Los anticuerpos en los sueros a estudiar son puestos en contacto con un antígeno fijado en una placa de microaglutinación. Luego de un periodo de incubación y numerosos lavados con la finalidad de lavar los excesos de anticuerpos, se añade un anticuerpo antiespecie (a la cual pertenece el suero probado) conjugado con una enzima que actuará sobre cierto sustrato y por consiguiente una coloración a la que se le medirá una absorbancia (Levett, 2001; Manual de procedimientos y estandarización para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis, 2013; Chaudhry y cols, 2013).

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospirosis en muestras clínicas. Los métodos basados en el ADN como es el caso de PCR que han permitido la identificación de especies de leptospirosis patógenas y no patógenas. La PCR se usa para detectar el ADN de *Leptospira* en muestras clínicas. Iniciadores (secuencias cortas de ADN que son específicas para leptospirosis), en combinación con una polimerasa del ADN estable al calor, en presencia de nucleótidos y sometidos a ciclos de temperatura, amplifican una sección del ADN de *Leptospira*. La PCR puede ser empleada con sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido ante o post-mortem (OMS, 2008; Cardona y cols, 2008).

#### **Southern Blot**

Esta técnica está enfocada en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospirosis en muestras clínicas. La técnica se basa en el empleo de ADN con secuencias específicas llamadas sondas. Fue desarrollada por E. M. Southern para la detección de genes específicos en el ADN celular. El ADN es digerido con una enzima de

restricción y los fragmentos son separados por tamaños mediante una electroforesis en un gel. Se realiza tinción con bromuro de etidio para comprobar la calidad de la electroforesis y del ADN. Posteriormente los fragmentos de ADN de doble cadena son parcialmente hidrolizados con un ácido débil y desnaturalizados con NaOH para permitir la transferencia. Posteriormente, el ADN es transferido a un filtro de nitrocelulosa, con lo que en el filtro queda representada una réplica de la disposición de los fragmentos de ADN presentes en el gel. A continuación el filtro se incuba durante un tiempo con la sonda marcada (radiactivamente o con un fluorocromo); durante la incubación la sonda se va hibridando a las moléculas de ADN de cadena sencilla de secuencia complementaria (o muy parecida). La sonda unida al fragmento de ADN complementario se puede visualizar en el filtro de una forma sencilla mediante una exposición a una película de rayos X para el caso de sondas radiactivas o con una película sensible a la luz, para el caso de sondas con fluorocromo (Enfermedades Infecciosas: Leptospirosis, 2014).

#### **Microaglutinación en Placa (MAT)**

La microaglutinación, es la prueba de referencia de la Organización Mundial de la Salud y está disponible en laboratorios especializados y de referencia, pero presenta una sensibilidad variable dependiente del número de serovares probados en el panel de evaluación serológica y de la inclusión de cepas locales, requiere sueros pareados para la detección de la seroconversión (que es el parámetro de confirmación de caso), la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es considerada la “prueba de oro” o la piedra angular del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica (serovar/serogrupo) en comparación con otras pruebas disponibles actualmente. Al utilizar leptospiras vivas se presenta el riesgo ocupacional de infección para el personal de laboratorio (Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis, 2012).

La MAT es el método o técnica en la que los sueros de pacientes se hacen reaccionar con suspensiones de antígenos vivos de serovares de leptospiras. Tras la incubación, las mezclas de suero-antígeno se examinan al microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación, y se titula la aglutinación. Anteriormente, el método se le conoció como prueba de lisis debido a la formación de grumos de lisis, ésta aglutinación tiene células vivas. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG. Los de clase IgM son los que se producen en la infección primaria y corresponden a una infección reciente o actual pero pueden ser detectables por meses e incluso años, los de clase IgG se generan en la infección secundaria y tardíamente en la infección primaria permaneciendo desde meses hasta años también. La técnica de MAT no discrimina entre el tipo de anticuerpo detectado. Los pacientes producen, normalmente, anticuerpos aglutinantes contra el serovar infectante; sin embargo, anticuerpos con reacción cruzada frente a otros serovares también son a menudo encontrados, siendo esto particularmente notable al inicio de la infección. La mayor ventaja de la MAT es su alta especificidad (Levett, 2001; Carrada y cols, 2002).

#### Características de la muestra

La muestra puede ser sangre completa, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) principalmente, incluso biopsia de tejidos infectados por leptospira, sin embargo la muestra de predilección y por ser más práctica su obtención es la sangre completa periférica. Para ello se recomienda sea extraída lo más temprano posible frente a la sospecha de la enfermedad, fase aguda de la enfermedad. Si las muestras no se van a procesar inmediatamente se deben colocar en microtubos y poner en congelación hasta el momento en que se vayan a procesar las mismas (Medrano y cols, 2011).

Se recomienda tener muestras pareadas para hacer un diagnóstico por laboratorio certero, por lo que para considerar un caso positivo se necesita un incremento de 4 veces el título en los sueros pareados sin importar el intervalo entre las muestras (Céspedes, 2005; Leveett, 2001). Se requiere estudiar muestras pareadas de 7 a 14

días de intervalo de la primera y si se observa que ha habido seroconversión, se considera de valor diagnóstico es necesario un intervalo más largo entre las muestras o muestreo repetido. Es importante considerar que para muestrear LCR deberá realizarse durante la fase aguda de la enfermedad y puede ser eficaz en orina después de la segunda semana del inicio de la enfermedad. Para muestras de orina debe realizarse el cultivo lo más pronto posible, ya que las espiroquetas sobreviven unas pocas horas en la orina con un pH ácido (Sandow y Ramírez, 2005).

#### Recolección de la muestra

Procedimiento que consiste en la obtención de uno o varios especímenes biológicos con el fin de encontrar la causa o factores etiológicos de patologías causadas en el humano. Por tal motivo es importante garantizar la calidad en la obtención de la muestra y la información que debe acompañarla durante la etapa preanalítica, analítica y postanalítica. Los errores en cualquiera de las etapas o fases analíticas de la muestra se traducen en pérdidas económicas y de tiempo importante para el paciente y el clínico, así como la mala utilización de recursos, y lo más grave, a diagnósticos erróneos de gran impacto en el pronóstico y la seguridad en la atención de los pacientes.

#### Antígenos

Los antígenos que se utilizan en ésta técnica son cultivos vivos de *Leptospira* (Sandow y Ramírez, 2005; Medrano y Cois, 2011). La prueba requiere de la bacteria con 10 días de crecimiento en medio de cultivo líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y requiere de evaluación previa como la edad, tiempo de incubación, temperatura, punto de corte y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación. De acuerdo con el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira*, el punto de corte se define como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación, dejando 50% de células libres, cuando se le compara con un control que consiste de cultivo diluido 1:2 en tampón fosfato salino (Carbrey, 1960; Bello-Piericcini

y Rodríguez, 2011). Para la realización de la prueba se utilizan cultivos jóvenes con una transmitancia del 60-70 % a 400 nm de longitud de onda (Sadow y Ramírez, 2005).

### **Inmunofluorescencia**

La técnica de inmunofluorescencia tiene la propiedad de emitir luz ultravioleta (UV), siendo emitidas a una longitud de onda variable y ser visible al ojo humano. La luz emitida entra en contacto con un fluorocromo por un lapso de tiempo corto, observándose una luz fluorescente indicando que la molécula se encuentra en estado de mayor energía o de excitación. Una de las características de esta técnica es la fuente luminosa (lámpara de mercurio o halógena) en donde se debe emitir la mayor cantidad de luz ultravioleta en el límite del espectro visible. La elección de la fuente de luz y los filtros depende del fluorocromo específico de acuerdo a los requisitos de excitación y emisión (Silva, 2007; INDRE, 2015).

#### **Tipos de fluorocromos y aplicaciones**

El uso de fluorocromos de diferente longitud de onda de excitación y su máxima emisión permite la detección simultánea de dos o más microorganismos, para esto se deben contar con un microscopio que permita observar los diversos espectros de colores. El empleo combinado de fluorocromos debe tener picos de emisión en los que no se presente solapamiento de espectros entre las sondas. Los marcadores que sean más foto estable se deben usar en muestras con baja cantidad de sitios diana. Dentro de los marcadores más usados para estudios microbiológicos, están los derivados de la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y carboxifluoresceína-N-hidroxisuccimida ester. De los derivados de la rodamina se encuentran la tetrametil rodamina isotiocianato y el rojo Texas (Hernández y Gómez, 2011).

El isotiocianato de fluoresceína, y lisamina rodamina son los fluorocromos más empleados en la inmunología para detectar y cuantificar los anticuerpos circulantes ocasionados por sustancias extrañas denominadas antígenos, producidas por bacterias, parásitos, virus y hongos (Montiel y cols, 1997; Fundora y cols, 2012).

Con frecuencia se utiliza esta técnica cuando hay la presencia de *Leptospira* en sedimentos de orina o en la medicina veterinaria para el análisis de tejidos. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia. Puede detectar *Leptospira* en los tejidos o fluidos del feto o de animales infectados (OMS, 2008).

#### Métodos de inmunofluorescencia directa e indirecta

Se presentan dos métodos de inmunofluorescencia, la directa (IFD) y la indirecta (IFI), las cuales pueden presentar variaciones en su sensibilidad, especificidad, rapidez de la técnica, cantidad mínima de muestra requerida aun cuando se encuentren contaminadas, no requiere procesos estériles, entre otros. La técnica de IFD se realiza en un solo paso de montaje, la muestra del paciente se coloca en un portaobjeto, adicionándole un anticuerpo marcado con un fluorocromo. Se deja reposar para que se realice una interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y se elimina el exceso de fluorocromo y se observa con un medio de montaje constituido de aceite de inmersión y glicerol. Al observarse la emisión fluorescente verde manzana, se considera una reacción positiva (Tortora y cols, 2007).

La Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en el que un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo, se utiliza para reconocer el anticuerpo primario del paciente. El marcaje inmunofluorescente se puede realizar en células fijadas sobre portaobjetos. Las muestras marcadas son examinadas bajo un microscopio de fluorescencia. La técnica se efectúa en dos pasos, la formación de un complejo del antígeno conocido con el anticuerpo del paciente y la colocación de un segundo anticuerpo específico marcado con un fluorocromo. Observándose en las reacciones positivas una fluorescencia de color verde manzana, indicando que existe una interacción Ag-Ac. La inmunofluorescencia indirecta es una alternativa que complementa el diagnóstico de leptospirosis y los estudios seroepidemiológicos. La inmunofluorescencia indirecta es una alternativa que complementa el diagnóstico de leptospirosis y los estudios

seroepidemiológicos afirman algunos investigadores, ver Figura 5 (Agudelo y cols, 2006; Tortora y cols, 2007).

#### Aplicaciones de la inmunofluorescencia

El uso de la inmunofluorescencia ha permitido grandes avances en el diagnóstico al contribuir como una técnica de laboratorio relativamente accesible por su costo, además de su implementación en laboratorios convencionales. Con el apoyo de la inmunofluorescencia se han generado nuevos diagnósticos en las áreas de bacteriología, Virología, Parasitología entre otras, ver Tabla 7 (Fraile M, Muñoz M, 2010; Huneus y cols, 2009).

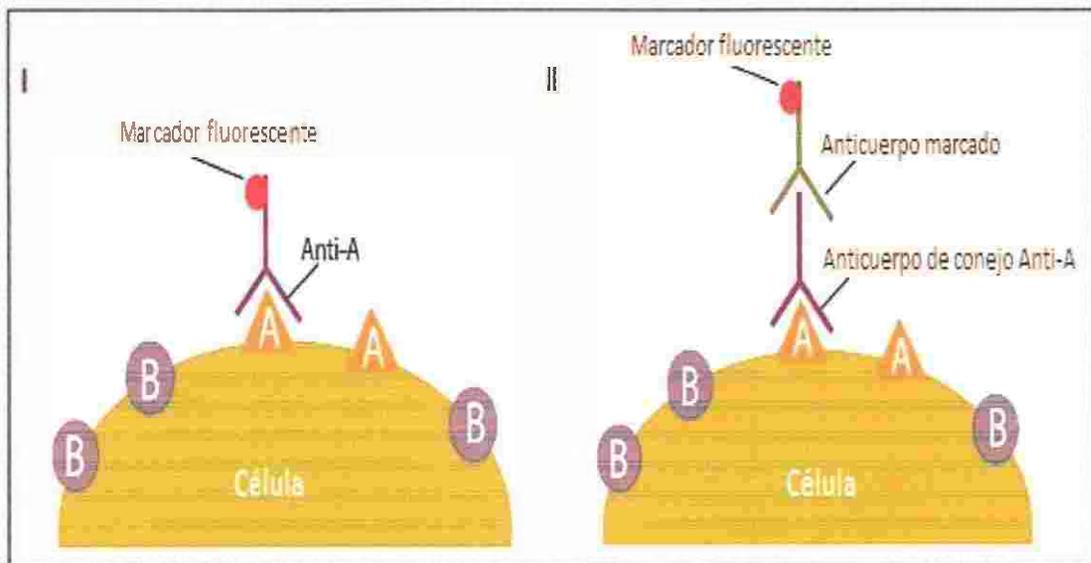


Figura 5. Principio de la inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI) (Gaz y Anduro, 2013).

Tabla 7. Aplicaciones diagnósticas de la inmunofluorescencia directa e indirecta (Suarez y cols, 2005; Rabagliati y cols, 2004; Palomino y cols, 2010; Figueras y cols, 2010; Leyva y Delgado, 2006).

Área de aplicación	Inmunofluorescencia directa	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>Bacteriología</b>	<i>Ej. -Chlamydia trachomatis</i>	<i>Ej. Coxiella burnetii</i>
<b>Virología</b>	<i>Ej. Virus de la influenza</i>	<i>Ej. - virus del dengue</i>
<b>Parasitología</b>	<i>Ej. Toxoplasma gondii</i>	<i>Ej. Acanthamoeba spp.</i>
<b>Micología</b>	<i>Ej. Pneumocystis jirovecii</i> <i>- Coccidioides immitis</i>	<i>Ej. - Candida albicans</i> <i>-Aspergillus spp.</i>
<b>Histopatología</b> <i>Principalmente en enfermedades infecciosas o autoinmunes</i>	----	<i>Ej. – Lupus eritematoso</i> <i>-Enfermedades renales</i>

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Población de Estudio y Tamaño de la Muestra**

El universo de estudio lo constituyó un total de 80 muestras obtenidas de pacientes provenientes de cuatro municipios del sur del Estado de Sonora (Álamos, Etchojoa, Huatabampo y Navojoa) que conforman la Jurisdicción Sanitaria No V en el periodo comprendido del 2013 al 2014, ver Figura 6. Las muestras fueron recolectadas de pacientes procedentes del sector salud o que fueron referidos al Laboratorio de Investigación Zoonosis y Enfermedades Tropicales (LIZET) ubicado en la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a los reglamentos generales de un laboratorio clínico, así como lo establecido por la Norma Oficial Mexicana, NOM-087-ECOL-SSA1. *Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo*. Así mismo se contó con la participación como colaboradores de los químicos del laboratorio SONORALABS.

### **Criterios de Inclusión**

Cursar con cuadro febril inespecífico, firmar una hoja de consentimiento donde acepte participar en el protocolo de investigación, accediendo a la toma de muestra sanguínea así como contestar y llenar un formato de registro clínico con la entrevista que el médico le realice.

### **Criterios de Exclusión**

Padecer hiperlipidemias, no estar en ayuno, encontrarse bajo el efecto de sustancias tóxicas (drogas o alcohol), no responder en su totalidad al cuestionario o no hacerlo claramente.

### **Recolección y Conservación de las Muestras**

La muestra que se obtuvo de los pacientes fue sangre total periférica de la siguiente manera:

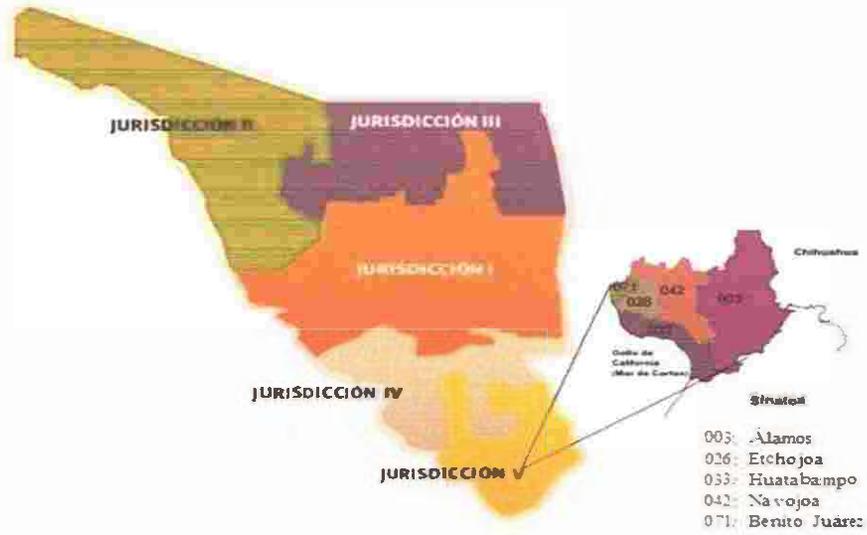


Figura 6. Jurisdicción Sanitaria No. V del estado de Sonora (Secretaría de Salud de Sonora, 2015; INEGI, 2010).

Se extrajeron aproximadamente entre 5 y 6 ml de muestra a cada paciente, utilizando la técnica de sistema cerrado Vacutainer. Después de 15 minutos transcurridos, se centrifugaron las muestras a 3500 rpm para obtener suero, mismos que se dispensaron en microtubos (alícuotas) para ser así, almacenados en un ultracongelador (Marca SANYO) a -70°C.

#### **Valoración Clínica**

La selección de los pacientes se hizo en base al diagnóstico clínico del síndrome febril inespecífico, después de ser valorados clínicamente mediante la exploración física e interrogatorio por parte del médico. En Anexos 1 y 2, se muestra el formato de registro médico de los pacientes cuyos signos correspondieron al síndrome febril con diagnóstico probable de leptospirosis así como también la carta de consentimiento de los pacientes para participar en la investigación. Posteriormente se les pidió a los pacientes firmar una carta de consentimiento para ingresarlos al protocolo de investigación.

#### **Detección de Anticuerpos IgM Contra *Leptospira interrogans***

La detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* se realizó de acuerdo a las especificaciones comerciales de tipo IgM Antibody Kit, Leptospirosis IFA (Marca FULLER Laboratorios, Numero catálogo LEM-120). Se incluyeron controles positivos y negativos los cuales permitieron validar la estabilidad del kit. La sensibilidad y especificidad de la técnica es de 89.2% y 98% respectivamente. Para la observación de las laminillas se utilizó un microscopio de fluorescencia (Marca Leica, DM LS), conectado a una fuente de luz HBO 100W y un filtro con rangos de excitación 470 - 490 nm y emisión 520 - 560 nm, ver Figura 7. La observación microscópica se efectuó por el método de inmunofluorescencia Indirecta sin utilizar cubreobjetos.

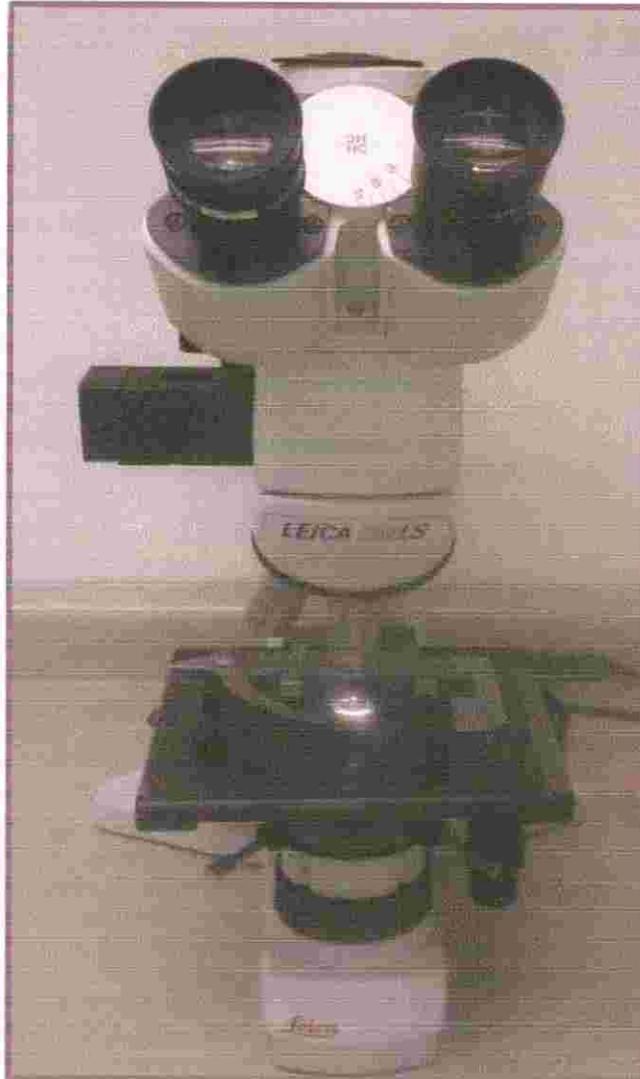


Figura 7. Microscopio de fluorescencia marca Leica.

### Preparación de Muestras y Reactivos

Los sueros y reactivos fueron preparados como indica el procedimiento del kit comercial, utilizados a temperatura ambiente (24-26°C). A continuación se describe el procedimiento:

- Se realizó una dilución 1:5 empleando suero del paciente (5 µl) y diluyente IgM comercial (20 µl). Se mezcló y reposó por 5 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 1500 rpm (Marca beckton Dickinson & co) durante 5 minutos. Del sobrenadante se recolecto 5 µl y se adicionó 45 µl de solución salina buffer de fosfato (solución PBS) obteniendo una dilución final de 1:50.
- Se emplearon tres controles positivos y un negativo: concentrado (50 µl), diluido 1:4 (10 µl control: 30 µl con solución PBS) y 1:8 (5µl control: 35µl con solución PBS). El control negativo se utilizó sin diluir.
- El montaje de los controles y muestras fueron adicionados en cada pocillo con un volumen de 10 µl en el siguiente orden: control positivo concentrado, diluido 1:4, diluido 1:8, control negativo y las muestras. Se realizan dos incubaciones en una cámara húmeda a  $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. La primera inmediatamente después de colocar los controles y las muestras. Al finalizar el tiempo de la primera incubación se realizaron dos lavados con solución de PBS a cada pocillo, cuidando de no contaminar los pocillos contiguos e inmediatamente se agregó una gota del conjugado enzimático a los controles y muestras (aproximadamente de 40 a 50 µl) se realiza la segunda incubación y se repite el mismo procedimiento de lavado. Se eliminó el exceso de solución de PBS con papel secante (por contacto) y se añadió una gota de medio de montaje (glicerol) a cada pocillo para la observación al microscopio de fluorescencia.

- Posteriormente se realizó un barrido con el objetivo 100x siguiendo el orden de montaje de los controles y posteriormente las muestras, para homogenizar el medio de montaje y en ese mismo orden se realiza la observación, ver Figura 8.
- Los controles positivos presentaron una fluorescencia verde manzana y el control negativo sin fluorescencia, ver Figura 9. Es positiva la muestra del paciente cuando la fluorescencia sea observada similar a la dilución del control positivo concentrado, dilución 1:4 y hasta dilución 1:8.

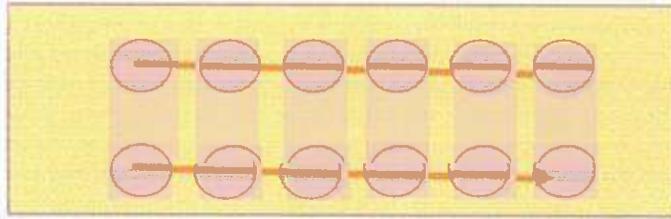


Figura 8. Barrido del medio de montaje y observación en el microscopio.



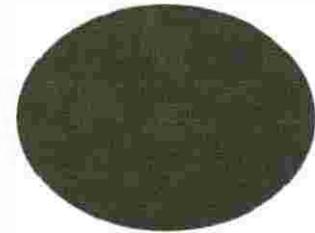
Control Positivo sin diluir



Control Positivo 1:4



Control Positivo 1:8



Control Negativo

Figura 9. Interpretación de controles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de Resultados y Discusión

Se estudiaron 80 muestras de pacientes procedentes del sur del estado de Sonora, los cuales fueron: Navojoa 53.75% (43/80), Huatabampo 26.25% (21/80), Etchojoa 12.5% (10/80) y Álamos 7.5% (6/80), ver Tabla 8. La población urbana representó un 67.5% (54 personas) y un 32.5% (26 sujetos) la población rural. El rango de edad varió entre los 4 a 52 años, con una media de 29.10. La distribución según el sexo correspondió al género masculino con 41.25 % (33/80) y femenino con 58.75% (47/80).

Los resultados obtenidos para la detección de anticuerpos tipo IgM contra el antígeno de *Leptospira interrogans* demostró un 51.25% (41/80) en total de casos positivos y un 48.75% (39/80) resultó negativo. La seropositividad en mujeres fue de 67.5% (26/80) y en hombres 32.5%% (13/80).

De los 41 pacientes positivos con diagnóstico del síndrome febril inespecífico sospechoso a *Leptospira interrogans*, estos presentaron con mayor frecuencia fiebre (100%), cefalea (98%), artralgia (71.2%), mialgia (62.2%), insomnio (37.5%), náuseas (36%) y escalofríos (33.7%). También se presentaron con menor frecuencia otros síntomas como: vómito (31%), dolor retrocular (29%), conjuntivitis (26.2%), fotofobia (17.5%), y dolor de espalda (12.5%), ver Figura 10.

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, considerada actualmente como enfermedad emergente, transmitida a los humanos por exposición ocupacional y contacto directo o indirecto con fluidos de animales infectados, como los roedores, caninos, porcinos y ganado vacuno. La presentación clínica del cuadro infeccioso representa un reto diagnóstico en áreas endémicas para esta zoonosis y otras enfermedades infecciosas que clínicamente se manifiestan con cuadros similares y que comparten el mismo perfil de riesgo desde el punto de vista epidemiológico y ambiental. Por lo anterior, la enfermedad puede ser subvalorada o subdiagnosticada

Tabla 8. Muestras analizadas por municipios.

Municipio	Personas	%	Hombres	Mujeres
Navojua	43	53.75	16	27
Huatabampo	21	26.25	8	13
Etchojoa	10	12.5	7	3
Álamos	6	7.5	2	4

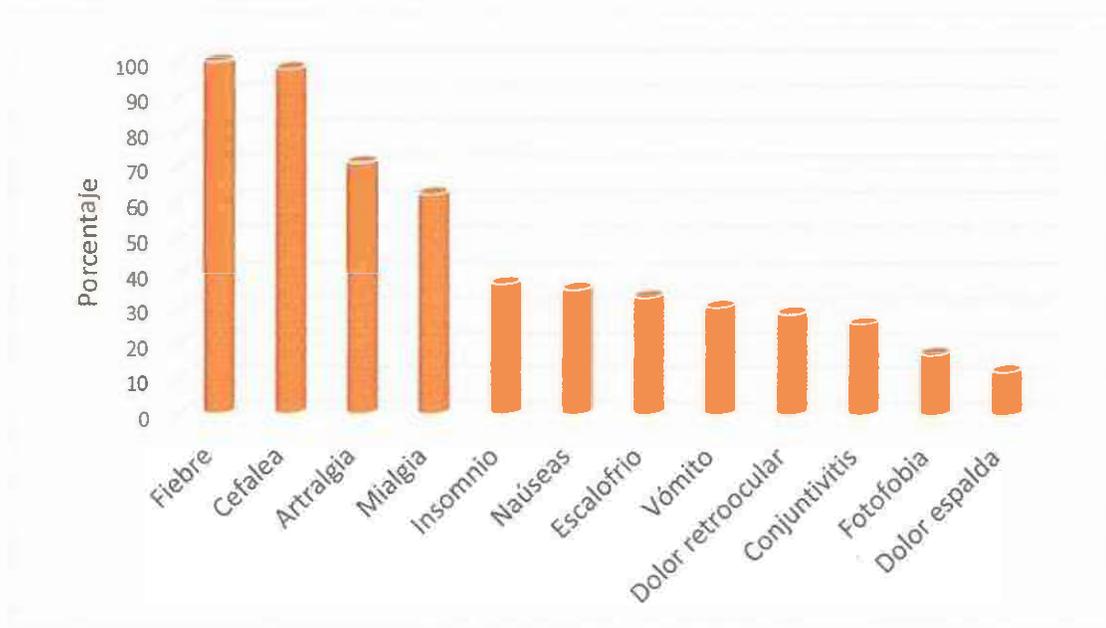


Figura 10. Síntomas clínicos presentados por los pacientes.

siendo identificada en la fase aguda de la enfermedad (Síndrome de Weil) donde incluye el compromiso de órganos como riñones, vaso y el hígado principalmente. En algunos casos solo se diagnostica por autopsia (Agudelo, 2005; Velasco y cols, 2009; Climans y cols, 2014).

Sonora es considerado uno de los estados del país con mayor incidencia de Leptospirosis reportado desde 2000 (Zúñiga y Caro, 2013), así mismo, Carrada y cols, 2005 mostraron la presencia de *Leptospira interrogans* en ganado vacuno, por otro lado, Gaz y Anduro, 2013, reportaron la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG contra el antígeno de *Leptospira interrogans* por el método de ELISA en pacientes procedentes del sur del estado de Sonora.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio los casos positivos de anticuerpos de tipo IgM contra *Leptospira interrogans* por IFI (51.25%), son similares a los reportados por Hernández y cols, (2014) en un estudio donde se analizaron 51 muestras y los resultados evidenciaron el 62.7%, casos positivos. Además Nosshin y Sedighe, 2012 reportaron la presencia de anticuerpos de tipo IgM de 90 muestras con una positividad del 46.66% realizado en Irán.

Por otra parte en Medellín, Colombia se realizaron investigaciones utilizando inmunofluorescencia indirecta para diagnosticar leptospirosis, cuyos resultados fueron del 22.4% de casos en el que los empleados presentaron títulos positivos de anticuerpos tipo IgM en una región lechera, entre 3.9 a 14.3% en un grupo de granjeros porcinos y 7% en un grupo de trabajadores de carnicerías y arroceras (Pradutkanchana y Cols, 2003), así mismo (Jaramillo y Cols, 2014) en un estudio de revisión se reporta la seroprevalencia en 3 estados de Colombia con 23.5, 25 y 25% diagnosticados por IFI.

La presencia de anticuerpos IgM en 41 pacientes de los 80 muestreados en el sur de Sonora, indica la fase activa de la enfermedad, ya que este tipo de anticuerpos aparecen tres días después de la infección y pueden persistir hasta por cinco meses, por lo cual se evidencia el reciente contacto con la bacteria, siendo resultados

comparables a los reportados por Nájera y cols, 2005. La presencia de anticuerpos IgM contra el antígeno de *Leptospira interrogans* en los distintos municipios del sur de Sonora puede deberse a las condiciones climáticas de la región, socioeconómica, por el contacto directo con los animales domésticos de los habitantes y aguas contaminadas con orina de los animales que fungen como vectores y reservorios de esta bacteria, (Álvarez y cols, 2011; Pulido y cols, 2014).

Los síntomas clínicos manifestados por los pacientes con resultados positivos son similares a los reportados por otros investigadores, presentando principalmente fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, conjuntivitis, dolor de espalda, arritmias, náuseas, fotofobia y vómito (Levinson, 2004; Vanasco y cols, 2012; Jaramillo y cols, 2014).

### Conclusiones

- Los resultados del estudio han demostrado la presencia de anticuerpos IgM antileptospira en pacientes con síndrome febril inespecífico indicando la presencia de *Leptospira interrogans*.
- Los datos clínicos de los pacientes con anticuerpos IgM guardan correlación con los signos y síntomas clínicos de la enfermedad.
- El 51.25% del total analizado demuestran que los pacientes cursan con la enfermedad activa.

### Recomendaciones

- Por motivos de seguimiento y diagnóstico para los pacientes, se recomienda la búsqueda de anticuerpos IgG contra *Leptospira interrogans*.
- Se recomienda la identificación de los serovares y serogrupos por el método de microaglutinación en placa. Así mismo, el empleo de técnicas moleculares para su confirmación y comparación de los serovares y serogrupos identificados.

### Fuentes bibliográficas

Agudelo P, Restrepo M, Lotero M, (2006). Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. En: Biomédica. (26): págs. 216-223.

Álvarez L, Calderón A, Rodríguez V, Arrieta G, (2011). Seroprevalencia de leptospirosis en una comunidad rural del municipio de Ciénaga de oro, Córdoba, Colombia. En: Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica. 14 (2): págs 75-81.

Baquero M, Patricia A, Hernández P, (2010). Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira sp.* En: Revista de Medicina Veterinaria. 19: págs. 101-111.

Batista N, Arencibia D, Rosario L, Jirón W, Duttman Ch, (2011). Perfil antigénico celular de cepas aisladas de *Leptospira* en León y Chinandega, Nicaragua. En: Revista científica Ars Pharmaceutica, España. 52 (4): págs. 12-17.

Cardona M, Moro R, López E, Perez J, Hernández C, (2008). Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. En: Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 28: págs. 24-30.

Carrada G, Calderón E, Martínez C, (2002). Leptospirosis: Pleomorfismo clínico en el síndrome febril. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 8 (3): págs. 128-132.

Carrada T, (2005). Leptospirosis humana. En: Revista mexicana de patología clínica. 52 (4): págs 246-256.

Carrizo A, Brihuega B, Etchechoury I, Arese A, Romero S, Romano M. I, Caimi K (2009). Identificación de reactivos inmunorreactivos de *Leptospira interrogans*. Revista argentina de microbiología. (41): págs. 129-133.

Céspedes M. (2005). Leptospirosis. Enfermedad Zoonótica Emergente En: Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 22(4): págs. 290-307

Chaudhry R, Das A, Premlatha M, Chourasia B. K, Chandel D. S, Dey A. B. (2013). Serological & molecular approaches for diagnosis of leptospirosis in a tertiary care hospital in north India: A 10-year study. En: Indian Journal of Medical Research. 137 (4): págs. 785-790.

Dammert N. (2005). Leptospirosis, una revisión bibliográfica. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. págs. 1-21.

Díaz J. A. (2015). Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de leptospirosis mediante aglutinación microscópica. En: Instituto de Diagnóstico y referencia Epidemiológico. (1): págs. 1-43.

Evangelista K. V., Coburn J (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. En: Future Microbiology. 5 (9): págs. 1-17.

Figueras C, Díaz C, Navarro M. L., Roselló M, Álvez F (2011). Infección fúngica invasiva: actualización. En: Infectología Pediátrica. Serie Protocolos de la AEP. Tercera Edición, Editorial ERGON, España. págs. 135-147.

Fraile M, Muñoz C (2010). Infección por *Coxiella burnetii*. En: Revista enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 28 (1): 29-32.

Fundora H, Puig Y, Chiroles S, Rodríguez A, Gallardo J, Milián Y,(2013). Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 51 (1):84-96

Gallegos A, Leandro V (2010). Leptospirosis. En: *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 67 (592): págs. 115-121.

García R, Reyes A, Basilio D, Ramírez M, Rivas B (2013). Leptospirosis; un problema de salud pública. En: *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 60 (1): págs. 57-70.

González A, Batista N, Ortiz M, Torres V, Infante J. F, González M (2010). Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. En: *VacciMonitor*, Centro de investigación, producción de vacunas y sueros, La Habana, Cuba. 11 (3): págs. 6-10.

González J. (2012). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis, En: *Comisión Nacional para la Vigilancia Epidemiológica*. Págs 14-35.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Levett P, Haake D. A. (2001). Leptospiral Proteins Recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. En: *Revista american society for microbiology*. 69 (8): págs. 4958-4968.

Guidugli F, Castro A, Átallah A (2009). Antibiotics for leptospirosis. Antibiotics for treating leptospirosis. Editorial Cochrane Hepato-Biliary Group, DOI: 10.1002/14651858.CD001306.pub2. págs. 1-23.

Hernández P, Gómez Arlen (2011). Leptospirosis: una zoonosis que afecta a la salud pública y la producción pecuaria. En: *Revista Científica Animal*. (4): págs. 15-23.

Huneeus A, Pumarino M, Schilling A, Robledo P, Bofil M (2012). Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes chilenas. En: Revista médica chilena. (137): págs. 1569-1574.

Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, (2013). *Leptospira interrogans*. En: Databio. págs. 1-4.

Laguna V. (2000). Leptospirosis. En: Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. págs. 1-46.

Levett P. (2001). Leptospirosis. En: *Clínica Microbiology Reviews*. 14 (2): págs. 296-326.

Levinson W. (2014). Espiroquetas. En: Libro de Microbiología e Inmunología, octava edición, Editorial Mc Graw Hill España. Págs. 202-203.

Leyva M, Delgado V (2006). Utilidad de la inmunofluorescencia directa en enfermedades del tejido conectivo. En: *Revista de dermatología peruana*. 16 (2): págs. 148-150.

Lugo B. L, Velasco L, Canales G, Velázquez J, Herrera E (2015). Detección de anticuerpos antileptospira en una población vulnerable del municipio de Ixhuatlancillo, Veracruz. En: *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 53 (2): págs. 158-163.

Luna A, Moles C, Gavaldón R, Nava V. C, Salazar G. F (2008). La leptospirosis canina y su problemática en México. En: *Revista Salud Animal*. 30 (1): págs. 1-11.

Maris S, Rago M (2011). Leptospirosis: revisión del tema a propósito de dos casos. En: *Biomedicina*. 6 (2): págs. 38-49.

Martínez M. (2014). Protocolo de vigilancia en salud pública: Leptospirosis. En: Instituto Nacional de Salud de la Republica de Colombia. Págs 2-17.

Medrano C, Díaz C, Dalmau E (2011). Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá. En: Revista Médica Veterinaria. (21): págs. 133-145.

Montiel F, Guzmán A (1997). Laboratorio de microbiología clínica: Diagnóstico de enfermedades infecciosas. En: boletín de la escuela de medicina, Universidad Pontificia Católica de Chile. 26 (3).

Moral M. (2014). Enfermedades infecciosas: Leptospirrosis, guía para el equipo de salud. En: Ministerio de Salud, Argentina. Págs. 5-46.

Palomino M, Gutiérrez V, Salas R (2010). Estandarización del método de centrifugación en placa para el aislamiento del virus Dengue. En: Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 27 (1): págs. 51-58.

Peña J. A. (2012). Estudio epidemiológico de leptospirosis caprina en la zona centro del Estado de Veracruz. Tesis de maestría para obtener el título de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. Región Veracruz. En: Universidad Veracruzana. Págs. 7-10.

Pieruccini S, Villamarín F (2011). Manual de leptospirosis. En: Instituto Nacional de Salud, Colombia. (1): págs. 1-20.

Pulido A, Carreño G, Mercado M, Ramírez P (2014). Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Sudamérica y el Caribe. En: Revista Universitas Scientiarum, Universidad pontificia, Facultad de ciencias, 19 (3): págs. 247-264.

Rabagliati R, Serri M, Montecinos L, Azócar T, Ferrés M (2007). Utilidad de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorio sincicial en adultos. En: Revista chilena de infectología. 24 (6): págs. 441-445.

Roca B. (2006). Leptospirosis. En: Revista médica Universidad de Navarra, 50 (2): págs. 44-47.

Romero E, Claudia M (2008). Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Organización Mundial de la Salud. Págs 9-106.

Romero M, Sánchez J, Hayek L (2010). Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. En: Revista Salud Pública. 12 (2): págs. 268-275.

Sánchez S, Espinoza D, Ríos C. A, Berzunza M, Becker I, (2015). Leptospirosis in Mexico: epidemiology and potential distribution of human cases. En: Plos One. 10 (7): págs. 1-16.

Sadow K, Ramírez W (2005). Leptospirosis. En: Revista Electrónica Veterinaria (REDVET). 6 (6): págs. 1-34.

Silva R. F., Riedemann S (2007). Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. En: Archivo de Medicina Veterinaria. 39 (3): págs. 269-274.

Suarez M, González A, Gardón B, Martínez R (2005). Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. En: Revista Biomédica. (16): págs. 21-27.

Tealdo M. S, Romero G. M, Autrey C. D, Samartino L (2007). Serología positiva a *Leptospira interrogans*, serovar cynopteri en caninos de la ciudad de Buenos Aires Argentina. En: INVET. 59 (1): págs. 59-65.

Valencia N, Camargo J, Muñoz H (2014). Leptospirosis, revisión de manifestaciones clínicas en pacientes del estado de Tabasco, hospitalizados en el Hospital Regional de Alta Especialidad Dr. Gustavo A. Rovirosa Pérez, durante el período 2007 a 2011. En: Revista enfermedades infecciosas y microbiología. 34 (4): págs 126-131.

Valle T, Lago Y, Cabrera A, Linares O, Ramos M (2014). Epidemiología de la leptospirosis humana: propuesta de intervención educativa. En: Revista Ciencias Médicas. 18 (4): págs. 555-565.

Vanasco N, Schmeling M, Chiani Y, Lottersberger J, Dante H (2012). Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. En: Revista salud pública de México. 54 (5): págs. 530-536.

Velasco O, Rivas B, Sánchez M (2009). Leptospirosis crónica en México: diagnóstico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia. En: Revista mexicana de patología clínica. 56 (3): págs. 157-167.

Velázquez H (2014). Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a Leptospirosis Bovina en tres regiones fisiográficas de la zona centro del sur del estado de Veracruz. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista: En: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Veracruzana. Págs. 4-25.

Velázquez P, Lorenzo A, Moreno I, Lizasoain J. C., Leza M. A, Moro A, (2008). Tratamiento para leptospirosis. En: Libro de farmacología básica y clínica, décimo octava edición, Panamericana. Págs. 832-833.

Verjovski S, Van M. A, Monteiro C. B, Camargo L E, Digiampetri L. A, Hartstkeerl R. A, Oliveira M. C, (2004). Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. En: Brazilian journal of medical and biological research. 37: págs. 459-478.

Villamizar R, Evelyne I (2011). El concepto serovar en *Leptospira*. En: Revista electrónica de veterinaria. 12 (7): págs. 1-4.

Zúñiga I. R., Caro J (2013). Panorama epidemiológico de la leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 2000-2010. En: Enfermedades infecciosas y microbiología. 33 (2): págs. 71-76.

## Anexos

<b>Anexo 1.</b> Formato de registro médico.....	44
<b>Anexo 2.</b> Carta de consentimiento del paciente.....	45
<b>Anexo 3.</b> Inserto kit comercial Leptospirosis IFI, anticuerpo IgM.....	46
<b>Anexo 4.</b> Diagrama de flujo, IFI anticuerpos IgM contra <i>Leptospira</i> .....	48
<b>Anexo 5.</b> Laboratorio SONORALABS.....	50

**Anexo 1. Formato de registro médico.**



**LABORATORIO DE INVESTIGACION  
ZOOINOSIS Y ENFERMEDADES TROPICALES  
DE LA REGION DEL MAYO**



FECHA: \_\_\_\_\_ Nº de muestra: \_\_\_\_\_

NOMBRE:	OCCUPACION:
SEXO:	DOMICILIO:
EDAD:	TEL:
LUGAR DE NACIMIENTO:	

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES FAMILIARES NO PATOLÓGICOS: \_\_\_\_\_

VIVIENDA: \_\_\_\_\_

CONTACTO O ANIMALES: PERROS, GATOS, RATONES, GANADO: \_\_\_\_\_ CERDOS, AVES: \_\_\_\_\_

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES: \_\_\_\_\_

AGUA: ENTUBADA, TINACO, CISTERNA, BOTES, OTROS: \_\_\_\_\_

**CUADRO CLINICO**

<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">FIEBRE <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 33%;">MIALGIA <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 33%;">NEURITIS <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>FEBRICULA <input type="checkbox"/></td> <td>DOLOR EN PIERNAS <input type="checkbox"/></td> <td>DISESTESIAS <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>ESCALOFRIOS <input type="checkbox"/></td> <td>SUDORACIONES NOCTURNAS <input type="checkbox"/></td> <td>CAMBIO DE CARACTER <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>DIÁFORESIS <input type="checkbox"/></td> <td>METEORISMO <input type="checkbox"/></td> <td>PÉRDIDA DE LA MEMORIA <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>ASTENIA <input type="checkbox"/></td> <td>DISTENCIÓN ABDOMINAL <input type="checkbox"/></td> <td>CONFUSIÓN MENTAL <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>ADINAMIA <input type="checkbox"/></td> <td>DOLOR ABDOMINAL <input type="checkbox"/></td> <td>ACOLIA <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>CEFALEA <input type="checkbox"/></td> <td>ANOREXIA <input type="checkbox"/></td> <td>DISURIA <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>DOLOR OCULAR <input type="checkbox"/></td> <td>HIPERESTESIA CUTÁNEA <input type="checkbox"/></td> <td>EDEMAS <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>FOTOFOBIA <input type="checkbox"/></td> <td>FATIGA FÁCIL <input type="checkbox"/></td> <td>SOMNOLENCIA DIURNA <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>CONGESTIÓN CONJUNTIVAL <input type="checkbox"/></td> <td>DISNEA DE ESFUERZO <input type="checkbox"/></td> <td>INSOMNIO <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>DISMINUCIÓN AGUDA VISUAL <input type="checkbox"/></td> <td>ICTERICIA <input type="checkbox"/></td> <td>ORQUITIS <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>ACUFENOS <input type="checkbox"/></td> <td>EXANTEMA <input type="checkbox"/></td> <td>ANSIEDAD <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>VERTIGO <input type="checkbox"/></td> <td>PETEQUIA <input type="checkbox"/></td> <td>DEPRESIÓN <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>PALPITACIONES <input type="checkbox"/></td> <td>EQUIMOSIS <input type="checkbox"/></td> <td>CUADRO PSICÓTICO <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>ARTRALGIA <input type="checkbox"/></td> <td>SANGRILDO <input type="checkbox"/></td> <td>TIPO MEDICAMENTO <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>DOLOR DE ESPALDA ALTA <input type="checkbox"/> MEDIA <input type="checkbox"/> BAJA <input type="checkbox"/></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	FIEBRE <input type="checkbox"/>	MIALGIA <input type="checkbox"/>	NEURITIS <input type="checkbox"/>	FEBRICULA <input type="checkbox"/>	DOLOR EN PIERNAS <input type="checkbox"/>	DISESTESIAS <input type="checkbox"/>	ESCALOFRIOS <input type="checkbox"/>	SUDORACIONES NOCTURNAS <input type="checkbox"/>	CAMBIO DE CARACTER <input type="checkbox"/>	DIÁFORESIS <input type="checkbox"/>	METEORISMO <input type="checkbox"/>	PÉRDIDA DE LA MEMORIA <input type="checkbox"/>	ASTENIA <input type="checkbox"/>	DISTENCIÓN ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	CONFUSIÓN MENTAL <input type="checkbox"/>	ADINAMIA <input type="checkbox"/>	DOLOR ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	ACOLIA <input type="checkbox"/>	CEFALEA <input type="checkbox"/>	ANOREXIA <input type="checkbox"/>	DISURIA <input type="checkbox"/>	DOLOR OCULAR <input type="checkbox"/>	HIPERESTESIA CUTÁNEA <input type="checkbox"/>	EDEMAS <input type="checkbox"/>	FOTOFOBIA <input type="checkbox"/>	FATIGA FÁCIL <input type="checkbox"/>	SOMNOLENCIA DIURNA <input type="checkbox"/>	CONGESTIÓN CONJUNTIVAL <input type="checkbox"/>	DISNEA DE ESFUERZO <input type="checkbox"/>	INSOMNIO <input type="checkbox"/>	DISMINUCIÓN AGUDA VISUAL <input type="checkbox"/>	ICTERICIA <input type="checkbox"/>	ORQUITIS <input type="checkbox"/>	ACUFENOS <input type="checkbox"/>	EXANTEMA <input type="checkbox"/>	ANSIEDAD <input type="checkbox"/>	VERTIGO <input type="checkbox"/>	PETEQUIA <input type="checkbox"/>	DEPRESIÓN <input type="checkbox"/>	PALPITACIONES <input type="checkbox"/>	EQUIMOSIS <input type="checkbox"/>	CUADRO PSICÓTICO <input type="checkbox"/>	ARTRALGIA <input type="checkbox"/>	SANGRILDO <input type="checkbox"/>	TIPO MEDICAMENTO <input type="checkbox"/>	DOLOR DE ESPALDA ALTA <input type="checkbox"/> MEDIA <input type="checkbox"/> BAJA <input type="checkbox"/>				
FIEBRE <input type="checkbox"/>	MIALGIA <input type="checkbox"/>	NEURITIS <input type="checkbox"/>																																																
FEBRICULA <input type="checkbox"/>	DOLOR EN PIERNAS <input type="checkbox"/>	DISESTESIAS <input type="checkbox"/>																																																
ESCALOFRIOS <input type="checkbox"/>	SUDORACIONES NOCTURNAS <input type="checkbox"/>	CAMBIO DE CARACTER <input type="checkbox"/>																																																
DIÁFORESIS <input type="checkbox"/>	METEORISMO <input type="checkbox"/>	PÉRDIDA DE LA MEMORIA <input type="checkbox"/>																																																
ASTENIA <input type="checkbox"/>	DISTENCIÓN ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	CONFUSIÓN MENTAL <input type="checkbox"/>																																																
ADINAMIA <input type="checkbox"/>	DOLOR ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	ACOLIA <input type="checkbox"/>																																																
CEFALEA <input type="checkbox"/>	ANOREXIA <input type="checkbox"/>	DISURIA <input type="checkbox"/>																																																
DOLOR OCULAR <input type="checkbox"/>	HIPERESTESIA CUTÁNEA <input type="checkbox"/>	EDEMAS <input type="checkbox"/>																																																
FOTOFOBIA <input type="checkbox"/>	FATIGA FÁCIL <input type="checkbox"/>	SOMNOLENCIA DIURNA <input type="checkbox"/>																																																
CONGESTIÓN CONJUNTIVAL <input type="checkbox"/>	DISNEA DE ESFUERZO <input type="checkbox"/>	INSOMNIO <input type="checkbox"/>																																																
DISMINUCIÓN AGUDA VISUAL <input type="checkbox"/>	ICTERICIA <input type="checkbox"/>	ORQUITIS <input type="checkbox"/>																																																
ACUFENOS <input type="checkbox"/>	EXANTEMA <input type="checkbox"/>	ANSIEDAD <input type="checkbox"/>																																																
VERTIGO <input type="checkbox"/>	PETEQUIA <input type="checkbox"/>	DEPRESIÓN <input type="checkbox"/>																																																
PALPITACIONES <input type="checkbox"/>	EQUIMOSIS <input type="checkbox"/>	CUADRO PSICÓTICO <input type="checkbox"/>																																																
ARTRALGIA <input type="checkbox"/>	SANGRILDO <input type="checkbox"/>	TIPO MEDICAMENTO <input type="checkbox"/>																																																
DOLOR DE ESPALDA ALTA <input type="checkbox"/> MEDIA <input type="checkbox"/> BAJA <input type="checkbox"/>																																																		

**Anexo 2. Carta de consentimiento del paciente.**

---

CARTA DE CONSENTIMIENTO

---

Navojoa, Sonora a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año 20\_\_\_\_\_

El (la) suscrito (a), de nombre \_\_\_\_\_

Por este conducto, hace constar que da su autorización para participar como paciente del estudio denominado: "DETECCIÓN DE *Leptospira interrogans* MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN PACIENTES PROCEDENTES DEL SUR DEL ESTADO DE SONORA" así como proporcionar información en relación a su salud y de tipo socioeconómica para el cumplimiento de los fines de investigación que tiene por objetivo dicho estudio, cabe mencionar que los datos personales del paciente quedarán en el anonimato.

Todos los datos obtenidos serán empleados para la realización de la tesis de licenciatura para obtener el título de QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO por el alumno Román Obed Cruz Gómez, con número de expediente 210216277 en la UNIVERSIDAD DE SONORA, UNIDAD REGIONAL SUR.

---

Dra. Norma Patricia Adán Bante

Responsable de Investigación

---

Firma

Paciente

**Anexo 3. Inserto kit comercial Leptospirosis IFI, anticuerpo IgM.**

### INSTRUCCIONES DE USO

**Leptospirosis IFA  
IgM Antibody Kit**

Referencia:	LEM-120
Presentación:	120 test
Almacenamiento:	2-8 C

Un inmunoensayo de fluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira spp.* en suero o plasma humanos

Sólo para uso en diagnóstico in vitro

CE

**FULLER**

1135 E. Trustar Avenue  
Folsom, California 92631 USA  
Phone +1-714-525-7660  
Fax +1-714-525-7513  
Email: info@fullerusa.com  
URL: www.fullerusa.com

EC

REP

**MediMark Europe Sarl**  
11, rue Emilie Zola - 107 2132  
F-10934 Quenast Cedex - Belgique

#### USO ESPERADO

El kit Leptospirosis IFA-IgM Antibody es destinado a la detección y semi-cuantificación de anticuerpos IgM humanos contra *Leptospira spp.* para ser usado con suero humano o plasma de leptospirosis en humanos.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La leptospirosis es una zoonosis aguda, aguda y repetitiva causada por espiroquetas patógenas de la especie *Leptospira interrogans*. Estos organismos se encuentran por todo el mundo en manantiales salvajes y depósitos, contaminando a sus huéspedes por contacto con animales infectados o indirectamente a través de orina infectada. La respuesta inmune tras la infección se puede detectar durante la primera semana de la enfermedad sintomática y la detección serológica del anticuerpo específico puede ser usada como una indicación indirecta de leptospirosis aguda.

Los portales IFA en este kit se basan en un ensayo por aglutinación de leptospires que actúa como el antígeno sustituto. El suero del paciente se diluye inicialmente 1:20 en Diluyente de Muestra IgM que contiene anticuerpos anti-IgM humanos. Este suero inhibe en entonces reaccionando a las partículas microscópicas del portal para permitir la reacción del anticuerpo del paciente con los leptospires. Posteriormente, los portales se lavan para eliminar el suero que no ha reaccionado y a continuación se añade un anticuerpo secundario anti-IgM humano marcado con Deltalite 158 Kanjugado, para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Tras una última incubación, los portales se lavan de nuevo para eliminar el Kanjugado que no ha reaccionado. Los sueros con anticuerpos pueden ser marcados con anticuerpos de Deltalite 158 Kanjugado, siendo una reacción positiva en estos casos leptospirosis aguda de un paciente que muestra un resultado positivo. Una reacción negativa ocurre cuando el paciente muestra un resultado negativo en el sistema de la obtención en el portal del Kanjugado Deltalite. Los resultados positivos deben ser confirmados con métodos más sensibles para determinar el resultado más adecuado a la situación local.

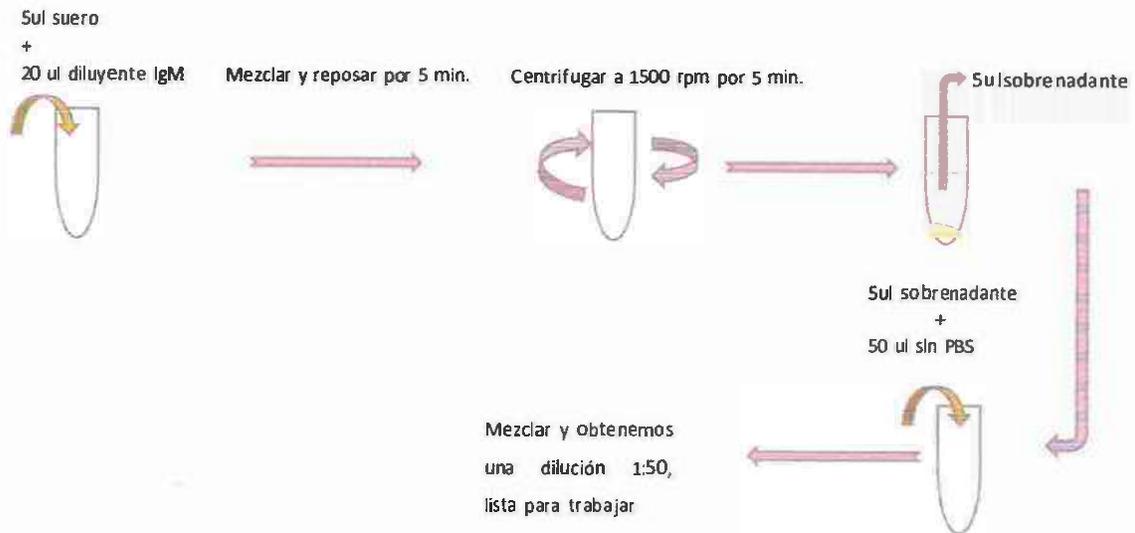
#### REACTIVOS

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">IFA Ag x 12</div> <p>10 portales (muestras de 22 portales cada uno) que contienen <i>Leptospira</i> (un prototipo) tipo de referencia (IC-1).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Portales Substrato (10)</div> <p>10 portales (muestras de 22 portales cada uno) que contienen <i>Leptospira</i> (un prototipo) tipo de referencia (IC-1).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONJ (E) C</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Conjugado IgG, 2.5 mL</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgG humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONT +</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Control Positivo, 0.5 mL</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONT -</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Control Negativo, 0.5 mL</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">DILU</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Diluyente de Muestra de IgM, 10 mL</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">MM</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">Medio de Montaje, 1 mL</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">SAL (WASH) PBS</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">PBS, 1 litro</div> <p>Una sola ampolla con el suero humano que contiene anticuerpos de referencia anti-IgM humano contra la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> (E) y partículas de Deltalite 158 Kanjugado de referencia (E) de referencia (E) de referencia (E).</p>

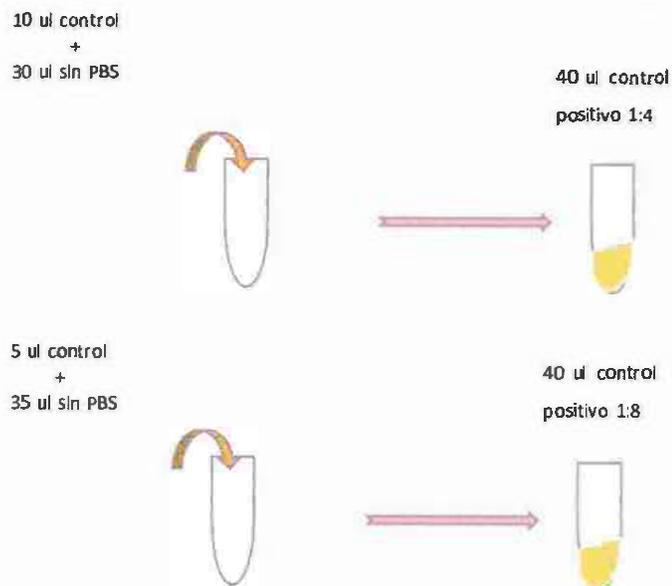


## Anexo 4. Diagrama de flujo, IFI anticuerpos IgM contra *Leptospira*.

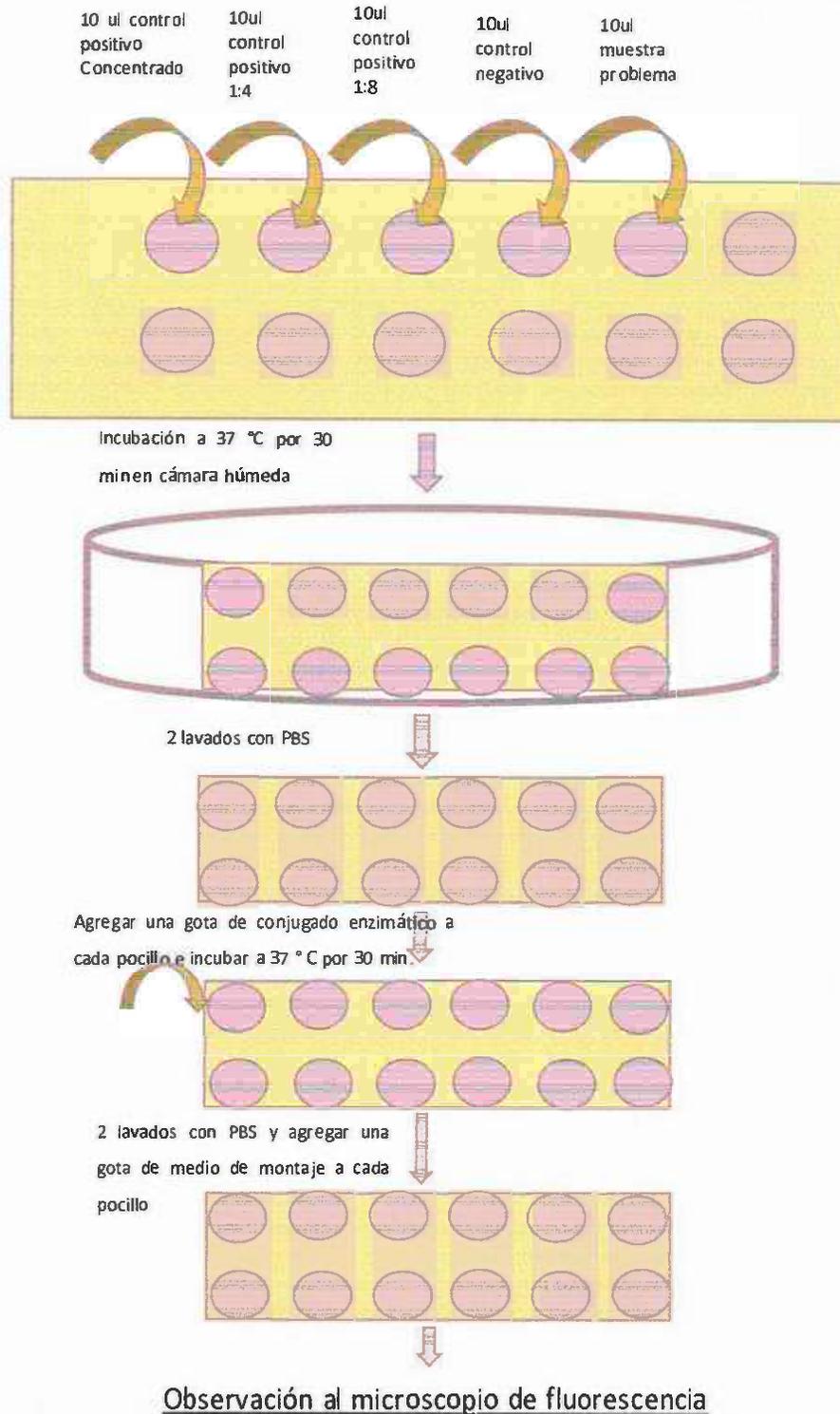
### 1. Preparación de muestras



### 2. Preparación de control positivo



### 3. Montaje de cada laminilla



**Anexo 5. Laboratorio SONORALABS.**

