



*El saber de mis hijos
hará mi grandeza*

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO, BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DETECCIÓN DE *LEPTOSPIRA* EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL INESPECÍFICO DEL SUR DEL ESTADO DE SONORA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTAN

GUADALUPE ABEL GAZ VEGA
DAPHNÉ SINAÍ ANDURO CASTRO

NAVOJOA, SONORA

MAYO DE 2013.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



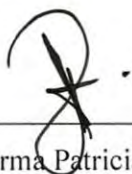
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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 **Guadalupe Abel Gaz Vega** y **Daphné Sinaí Anduro Castro**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



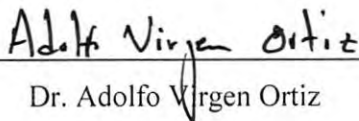
Dra. Norma Patricia Adan Bante

Directora



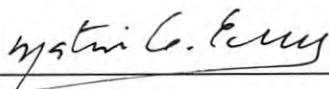
Dr. Danilo Manuel González Román

Asesor



Dr. Adolfo Virgen Ortiz

Asesor



Q. B. Martin Gustavo Echeverría Jacobo

Asesor

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.



Q. B. Rosa Amelia Vázquez Curiel

Jefe de Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis primeramente a dios por haberme permitido llegar a este punto de mi vida y haberme brindado salud para conseguir mis objetivos.

*A mi padre **Abel Gaz** y mi madre **Ramona Vega** que tanto amo por ser la parte fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo.*

*A mis hermanos **Joel** y **Sonia Carrizoza** que aun que no estuvieron presentes físicamente siempre me apoyaron y me motivaron para seguir adelante.*

*A mis sobrinos **Ary**, **Yaniel**, **José** y **Dylan** que aun que no los veo muy a menudo me brindaron motivación y alegría.*

*Un agradecimiento muy especial a la **Dra. Paty** por haberme brindado la oportunidad de trabajar con usted, gracias también por ayudarme en la redacción de esta tesis. Así mismo le agradezco por el apoyo emocional y profesional que me brindo; también agradezco su enorme paciencia hacia las bromas que día tras día hacía.*

*Gracias a mi compañera de tesis **Daphné**, a pesar de que en veces no coincidíamos en algunas y terminábamos en pleito siempre encontrábamos la manera de trabajar de una manera pasiva.*

***Dr. Danilo** gracias por su motivación y ayuda en el aspecto personal y profesional, por los consejos, conocimiento y experiencias propias que me brindo antes y durante la presente tesis.*

***Dr. Virgen** gracias por su ayuda en la elaboración del presente trabajo así como el conocimiento que compartió y los consejos que me daba antes de presentar cada seminario.*

***Químico Echeverría** gracias por sus enseñanza y su conocimiento brindado tanto en la tesis como en mi formación profesional.*

***Dr. Jesús Rosas** gracias por sus asesorías y conocimientos brindados en el área de estadística, ya sabe que a mí no se me da muy bien.*

*Gracias a la profesora **Rosa Amelia** por sus experiencias personales y profesionales brindadas, así como también los consejos que me dio para animarme a presentar el examen profesional.*

*Gracias **QB. Imay**, **MC. Ximena**, **Q. Rosas**, **Q. Álica Román** y a todos aquellos maestros que marcaron cada etapa de mi camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.*

*Gracias a **Ramoncita Encinas** por aguantarme todos los días en el departamento y por aguantar todas las bromas que le hacía.*

*Gracias a mis **amigos**, que en ocasiones los deje plantados por encontrarme trabajando en mi tesis, finalmente termine ahora si no habrá pretextos. Por ultimo gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración de este proyecto.*

Dedicatoria y agradecimientos Abel

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

*A mis padres, **Rosario** y **José**, porque gracias a ellos me he convertido en la gran persona que soy, los amo.*

*A mis hermanos (**José**, **Bere** y **Peke**) con ustedes he compartido buenos y malos momentos, pero siempre juntos, gracias a dios.*

*A mis sobrinos: **Adria**, **Annel**, **Aylin**, **Alan**, **Danna**, estos enanitos que llenan de luz cada día de mi vida, sin dejar de mencionar al angelito que se encuentra en el cielo cuidando de nosotros, que aun que fue un tiempo muy corto el que te tuvimos con nosotros, fue el tiempo suficiente para amarte de igual manera. Los amo. Doy gracias a dios por haberme dado vida para realizar una de mis metas en la vida, y regalarme una familia a la cual amo con todo mi corazón.*

*Gracias a mi compañero de trabajo (**Abel**), junto a él adquirí nuevos conocimientos en la realización de esta tesis y durante el transcurso de mi carrera.*

***Dra. Paty**, gracias por permitir realizarme en el ámbito profesional y todo lo aprendido gracias a usted profe, así como su enorme apoyo para la realización de esta tesis.*

***Dr. Danilo**, por su apoyo cuando más lo necesitamos, así como también el conocimiento brindado y sus experiencias compartidas.*

***Dr. Virgen**, por sus conocimientos que ayudaron a enriquecer la presente tesis.*

***QB. Echeverría**, porque gracias a usted tuve una buena formación profesional y ayuda para la realización del presente trabajo.*

***Dr. Rosas**, por su asesoramiento en lo estadístico ya que de no ser por su ayuda nos habría sido muy complicado comprender.*

*A mis maestros, que contribuyeron en mi formación académica para ser un buen profesionista: **QB. Rosa Amelia**, **QB. Imay**, **MC. Ximena**, **QB. Alicia**, **QB. Rosas**. Que aunque sé que aún me queda un largo camino por recorrer, no sería nada sin buenos cimientos.*

*A la secretaria de la Jefatura de departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, **Ramoncita**, por su ayuda y apoyo, eres una excelente persona, te aprecio mucho.*

A mis amigas: Perla, Lucia, Estela y Julia, las quiero mucho.

Y por último pero no por ello menos importante a todas y cada una de las personas que me brindaron una parte en su vida.

Dedicatoria y agradecimientos Daphné

ÍNDICE

APROBACIÓN.....	II
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	III
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABLAS.....	XIII
JUSTIFICACIÓN.....	XIV
OBJETIVOS.....	XV
HIPÓTESIS	XVI
RESUMEN.....	XVII
ORDEN SPIROCHAETALES	1
Estructura de las espiroquetas.....	1
Movilidad de espiroquetas	2
Clasificación de espiroquetas	5
<i>Treponema</i>	7
<i>Borrelia</i>	9
<i>Leptospira</i>	10
LEPTOSPIRA	11
Morfología.....	11
Estructura.....	13
Estructura antigénica	13
Especies del genero <i>Leptospira</i>	16

LEPTOSPIROSIS	18
Síndrome febril inespecífico.....	18
Enfermedad por <i>Leptospira</i>	20
Etiología	22
Epidemiología.....	22
Patogenia	26
Signos clínicos	27
Prevención y control	29
MÉTODOS GENERALES DE IDENTIFICACIÓN	30
Cultivo	30
Microscopia de campo oscuro	32
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
Técnica de Microaglutinación (MAT).....	35
Inmunofluorescencia (IFA).....	36
Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA).....	38
Métodos de ELISA.....	38
Método indirecto	38
Método directo	39
Método sándwich	39
Características de los Antígenos/Anticuerpos	41
Tipos y función de inmunoglobulinas.....	43

MATERIAL Y MÉTODOS	46
Población de estudio y tamaño de muestra	46
Criterios de inclusión y exclusión	46
Diagnóstico del síndrome febril inespecífico	48
Toma de muestra y transporte	48
Procedimiento de extracción sanguínea	49
Separación de la muestra	53
Observación en el microscopio de campo oscuro	53
Detección de anticuerpos contra <i>Leptospira interrogans</i>	54
Preparación de la muestra y reactivos	54
Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgG	55
Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgM	57
Interpretación de los controles para la detección de anticuerpos IgG e IgM	59
Interpretación de resultados de las lecturas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG	59
Interpretación de resultados de las lecturas de ELISA para la detección de anticuerpos IgM	60
Análisis estadístico de los resultados en la detección de anticuerpos IgG e IgM contra <i>Leptospira</i>	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
Detección de espiroquetas por microscopía de campo oscuro	65
Detección de anticuerpos IgG contra <i>Leptospira</i>	67
Detección de anticuerpos IgM contra <i>Leptospira</i>	72

Reacciones cruzadas en la detección de anticuerpos IgG e IgM contra <i>Leptospira</i>	76
CONCLUSIÓN	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

No	FIGURAS	PAGINA
1	A) Aspecto longitudinal de la espiroqueta típica. B) Micrografía de un <i>Treponema</i> con filamentos axiales que se extienden a una distancia más larga que la longitud de la célula.	3
2	Movilidad de las espiroquetas a) Micrografía electrónica de transmisión de espiroqueta mostrando la posición del endoflagelo. b) Sección transversal de una espiroqueta mostrando la disposición del cilindro protoplasmático, endoflagelos y vaina externa, así como la manera por la que la rotación del endoflagelo puede generar a su vez la rotación del cilindro protoplasmático y la vaina externa.	4
3	Filamentos Axiales: a) Micrografía de <i>Leptospira</i> donde se muestra el filamento axial. b) filamentos axiales envolviéndose alrededor de la espiroqueta. c) corte transversal de la espiroqueta mostrando la posición de los filamentos axiales.	14
4	Estructura de la membrana celular de <i>Leptospira</i> .	15
5	Estados reportados con leptospirosis en México en el periodo 2003-2008.	25
6	Naturaleza bifásica de la leptospirosis y estudios importantes.	28
7	Diferencia entre el microscopio de campo claro y campo oscuro.	33
8	Prueba de anticuerpos fluorescentes directos (I) se usan anticuerpos que reconocen antígenos específicos en la superficie celular. En el formato de prueba indirecto (II), la detección se basa en un secundario (anti-especie) anticuerpo conjugado con un marcador fluorescente.	37
9	Variaciones de la técnica ELISA a) ELISA indirecto b) ELISA en sándwich c) ELISA directo.	40
10	Diagrama esquemático de la estructura de las inmunoglobulinas.	45
11	Zona de investigación en el sur del estado de Sonora.	47
12	Formato de registro médico.	50
13	Carta de consentimiento.	51
14	Extracción de muestra sanguínea.	52
15	Intensidad de coloración de la reacción en los pozos para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra <i>Leptospira</i> .	70

LISTA DE TABLAS

No	TABLAS	PAGINA
1	Clasificación de género de espiroquetas y principales características.	6
2	Características diferenciales de espiroquetas patógenas.	12
3	Principales enfermedades producidas por <i>Leptospira interrogans</i> .	17
4	Causas distintas asociadas etiológicamente al síndrome febril inespecífico.	19
5	Principales medios de cultivo para <i>Leptospira</i> .	31
6	Signos y Síntomas relacionados con el síndrome febril inespecífico.	64
7	Resultados de la observación por microscopia de campo oscuro.	66
8	Resultados espectrofotométricos para la detección anticuerpos IgG.	69
9	Resultados de la detección de anticuerpos IgG contra <i>Leptospira</i> de acuerdo al lugar de procedencia.	71
10	Resultados espectrofotométricas en la detección anticuerpos IgM.	73
11	Resultados de la detección de anticuerpos IgM contra <i>Leptospira</i> de acuerdo al lugar de procedencia.	75
12	Reacciones Cruzadas para los anticuerpos IgM e IgG.	77

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias de la familia *Spirochaetales*, que comprenden las espiroquetas del género *Leptospira*, *Borrelia* y *Treponema*, tienen en común en su cuadro clínico algunos síntomas, principalmente en el síndrome febril, y se requiere confirmar la presencia de estas bacterias, con medios diagnósticos tecnológicamente desarrollados, como causante del síndrome febril inespecífico.

El síndrome febril inespecífico es una entidad clínica, la cual, se presenta en todas las regiones del mundo con una incidencia del 15% sin confirmación etiológica. En México, se han reportado casos del síndrome febril inespecífico sin diagnóstico definitivo (Arce Salinas *et al.*, 2005).

El Sistema Nacional de Salud reportó para el estado de Sonora en el 2001 la presencia de 16,744 casos con el síndrome febril inespecífico sin diagnóstico definitivo, así mismo, reportó la presencia de *Borrelia* en 56 casos de fiebre recurrente y 212 casos de otras enfermedades debidas a espiroquetas. Para el 2010 reportó la presencia de *Treponema pallidum* con 31 casos positivos. Flores Baca (2008) reportó la presencia de espiroquetas compatibles a *Leptospira* con el síndrome febril inespecífico en el sur del estado de Sonora. Dado que el síndrome existe y continúa sin conocerse el agente etiológico que la produce en muchos de los casos reportados, es importante que se realicen investigaciones encaminadas a estudiar la asociación de este síndrome con probable agentes causales.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación entre el síndrome febril inespecífico y la detección de anticuerpos contra *Leptospira* en pacientes provenientes del sur del estado de Sonora.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✦ Identificar la presencia de espiroquetas compatibles a *Leptospira* en sangre periférica de pacientes con síndrome febril inespecífico provenientes del sur del estado de Sonora mediante microscopia de campo oscuro.
- ✦ Caracterizar la espiroqueta identificada en el suero de pacientes con síndrome febril inespecífico del sur del estado de Sonora detectando anticuerpos IgG e IgM mediante la técnica de ELISA.

HIPÓTESIS

El síndrome febril inespecífico está asociado a la presencia de *Leptospira* en pacientes del sur del estado de Sonora.

RESUMEN

Las bacterias de la familia *Spirochaetales*, que comprende las espiroquetas del género *Leptospira*, *Treponema* y *Borrelia*, tienen en común en su cuadro clínico, algunos síntomas, principalmente el síndrome febril, y se requiere confirmar la presencia de estas bacterias con medios diagnósticos tecnológicamente desarrollados como causante del síndrome febril inespecífico.

El síndrome febril inespecífico es una entidad clínica, que se presenta en todo el mundo, en donde la confirmación etiológica es difícil. México ha reportado casos del síndrome febril inespecífico sin diagnóstico definitivo. El sur del estado de Sonora ha reportado estudios previos de la presencia de espiroquetas y el síndrome febril inespecífico mediante microscopia de campo oscuro (Flores Baca, 2008). Dado que el síndrome existe y continúa sin conocerse el agente etiológico que la produce en muchos de los casos reportados, el presente estudio tiene como finalidad relacionar este síndrome con la presencia de espiroquetas del género *Leptospira* por medio del diagnóstico clínico, microscopia de campo oscuro y análisis de ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira*.

Leptospira es causante de la enfermedad llamada leptospirosis o enfermedad de Weil, es conocida como la gran simuladora, por presentar una variedad de signos y síntomas que suelen confundirse con otras enfermedades producidas por bacterias de la familia de las espiroquetas. Las técnicas de identificación para esta bacteria son poco utilizadas, por ello, se necesita implementar métodos sencillos, rápidos y de bajo costo.

El diagnóstico de la leptospirosis es difícil debido a que *Leptospira* no se observa en el microscopio convencional, el cual es utilizado en los estudios de rutina. Sin embargo, la bacteria puede ser observada en microscopio de campo oscuro permitiendo la detección rápida de espiroquetas compatibles a *Leptospira*, lo cual ayuda al diagnóstico clínico.

Otra técnica que puede ser utilizada es el método ELISA, el cual permite la detección de anticuerpos de tipo IgG e IgM, que se pueden presentar durante el desarrollo de la enfermedad (IgM) o como anticuerpos de memoria (IgG), el uso de este método permite realizar el seguimiento epidemiológico de los casos sospechosos de leptospirosis.

En el presente trabajo se estudiaron 137 pacientes provenientes del sur del estado de Sonora. Las muestras de los pacientes fueron analizadas por microscopia de campo oscuro logrando resultados positivos en un 95% de los casos, así mismo, se utilizó el método ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira* obteniendo una positividad del 43% y 26% respectivamente.

ORDEN SPIROCHAETALES

Las espiroquetas son bacterias Gram negativas, dotadas de movimiento, enroscadas formando una apariencia de espiral y flexibles. Se encuentran extensamente distribuidas en ambientes acuosos y en diversos animales, en ciertas ocasiones pueden ser patógenos para el hombre, tal es el caso de la sífilis una enfermedad de transmisión sexual, leptospirosis, enfermedad de Lyme entre otras (Madigan *et al.*, 2003).

Estructura

La estructura de la espiroqueta, está conformada por un cilindro protoplasmático de forma helicoidal, donde se fijan uno a varios flagelos, todo ello envuelto por una membrana externa. El cilindro protoplasmático está constituido por protoplasma y núcleo, los cuales se encuentran limitados por la membrana citoplasmática y la pared celular. La membrana citoplasmática está conformada por una delgada capa de peptidoglicano, la cual es responsable de dotarla de flexibilidad y una forma en espiral (Pumarola *et al.*, 1987).

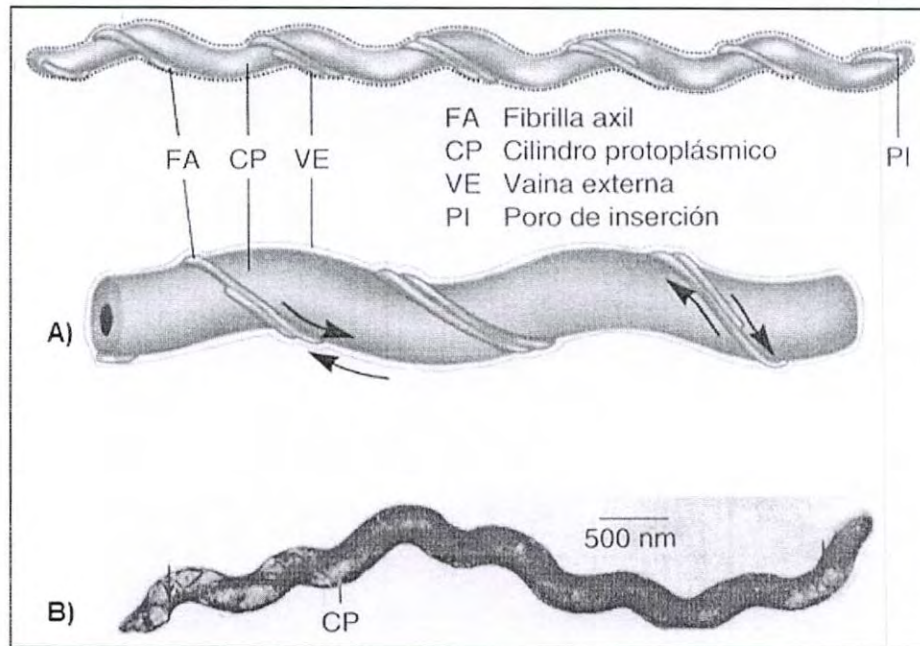
Los flagelos tienen una estructura igual a otras bacterias. Se encajan por medio de discos de adherencia en la región subterminal de ambas extremidades y después de una acodadura se dirigen hacia la otra extremidad y pueden entrecruzarse o no en el centro. Debido a su particular ubicación entre la capa de peptidoglicano y la membrana externa han adoptado el nombre de flagelos internos axiales a periplasmáticos.

La figura 1 muestra el flagelo de la espiroqueta (también denominado filamento axial o endoflagelo) están constituidos de un cuerpo, su vaina y un aparato de inserción (Pumarola *et al.*, 1987).

La membrana externa es una envoltura flexible y delicada, de gran importancia para la integridad de la espiroqueta. Es de carácter lipoproteica y contiene lipopolisacáridos, que conforman la mayoría de los antígenos específicos de la bacteria (Pumarola *et al.*, 1987).

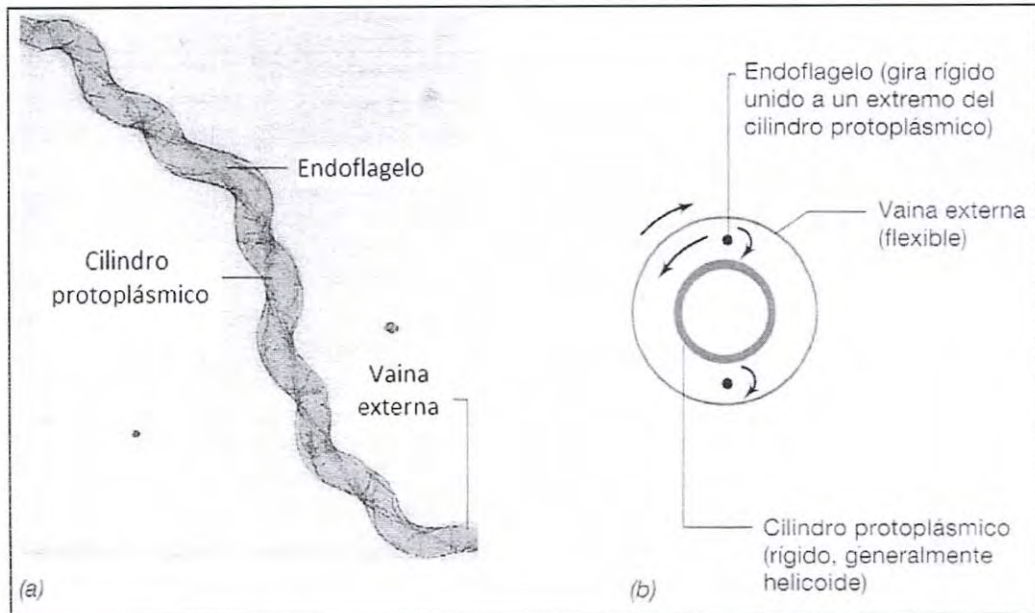
Movilidad

Su movilidad está dada por flagelos que emergen de cada extremo (figura 2). Sin embargo, a diferencia de los flagelos de otras bacterias, los flagelos de las espiroquetas se doblan hacia atrás desde cada extremo sobre el cilindro protoplásmico, quedando ubicados en el espacio periplásmico y se encuentran en la parte intermedia de la célula en lo que algunos han llamado *endoflagelos* (Madigan *et al.*, 2003).



Fuente: Ryan y Ray, 2011.

Figura 1. A) Aspecto longitudinal de la espiroqueta típica. B) Micrografía de un *Treponema* con filamentos axiales que se extienden a una distancia más larga que la longitud de la célula.



Fuente. Madigan *et al.*, 2003

Figura 2. Movilidad de las espiroquetas. a) Micrografía electrónica de transmisión de espiroqueta mostrando la posición del endoflagelo. b) Sección transversal de una espiroqueta mostrando la disposición del cilindro protoplasmático, endoflagelos y vaina externa, así como la manera por la que la rotación del endoflagelo puede generar a su vez la rotación del cilindro protoplasmático y la vaina externa.

Clasificación

Las espiroquetas se clasifican sobre la base de su hábitat, características microbiológicas, ARN ribosómico y patogenicidad, las cuales, se dividen en ocho géneros primarios: *Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia*, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Leptonema*, *Brachyspira* y *Brevinema*, cuyas características generales se describen en la tabla I (Madigan *et al.*, 2003).

La familia *Spirochaetales* comprende tres géneros que son patógenos para el ser humano y para algunos animales: *Treponema* que es el agente causal de las enfermedades llamadas treponematosis, *Borrelia* que causa la fiebre recurrente o enfermedad de Lyme, y *Leptospira* que produce la leptospirosis humana (Fauci *et al.*, 2008).

Tabla 1. Clasificación de género de espiroquetas y principales características

Genero	Dimensiones (µm)	Numero de especies reconocidas	Características generales	Numero de endoflagelos	Habitat	Enfermedad
<i>Cristispira</i>	30 – 150 x 0,5-3,0	1	3-10 vueltas completas; flagelos visibles en microscopio de contraste de fases.	>100	Tracto digestivo de molusco	Ninguna
<i>Spirochaeta</i>	5- 250 x 0,2 - 0,75	14	Anaerobios o aerobios facultativos; poco o muy enrollados.	2-40	Acuaticos; vida libre, agua dulce o salada	Ninguna
<i>Treponema</i>	5 – 05 x 0,1 - 0,4	20	Microaerofilicos o anaerobios, vueltas helicoidales o aplanadas con una amplitud de hasta 5 µm.	2-32	Comensal o parasito de humanos u otros animales	Sifilis Pinta Frambresia Disenteria Porcina
<i>Borrelia</i>	8 – 30 x 0,2 - 0,5	31	Microaerofilicos 5-7 vueltas de 1 µm de amplitud.	7-20	Humanos y otros animales	Fiebre Recurrente Enfermedad de Lyme
<i>Leptospira</i>	6 – 20 x 0,1	13	Aerobios, vueltas apretadas con extremos en forma de gancho. Requieren de acidos grasos de cadena larga.	2	Vida libre o parasito de humanos Otros mamiferos	Leptospirosis
<i>Leptonema</i>	6 – 20 x 0,1	1	Aerobios. No requieren acidos grasos de cadena larga.	2	Vida libre	Ninguna
<i>Brachyspira</i>	7 – 10 x 0,35 - 0,45	8	Anaerobios	8-28	Intestino de animales de sangre caliente	Diarreas En pollos y cerdos
<i>Brevinema</i>	4 – 5 x 0,2 - 0,3	1	Microaerofilicos, forma una rama profunda en el linaje de las espiroquetas, como se deduce de la secuencias del 16s, rRNA	2	Sangre y tejidos de ratones	Infecciones en ratones de laboratorios

Fuente: Modificado de Madigan *et al.*, 2003.

Treponema

Son microorganismos delgados que miden alrededor 0.2 μm de ancho y 5 a 15 μm de largo, las espirales solo pueden observarse con tinción inmunofluorescente o iluminación en campo oscuro. La movilidad activa, gira continuamente alrededor de sus endoflagelos aun después de unir sus extremos adelgazados (Brook *et al.*, 2008).

Es uno de los géneros perteneciente a la familia de las espiroquetas, comprende especies patógenas para el ser humano tales como:

- *Treponema pallidum* (subespecie *pallidum*): agente etiológico de la sífilis venérea que es responsable de las infecciones de transmisión sexual, se puede transmitir durante relaciones sexuales, por contacto con las lesiones externas, por transfusión sanguínea y por vía transplacentaria (Chungara *et al.*, 2006).
- *Treponema pallidum* (subespecie *endemicum*): agente causal de la sífilis endémica (bejel) puede causar lesiones desfigurantes y deformidades en huesos y cartílago, la infección se puede transmitir por contacto directo, por besos o al compartir utensilios para beber (Fauci *et al.*, 2008).
- *Treponema pallidum* (subespecie *pertenuae*): agente etiológico del pian o frambesia enfermedad que se caracteriza por la aparición de lesiones primarias a la que le siguen múltiples lesiones cutáneas diseminadas, la transmisión del pian ocurre por contacto directo con personas infectadas o de manera indirecta por las moscas *Hippelates pallipes* (Meheus, 1996).

- *Treponema carateum*: agente etiológico de la pinta o mal del Pinto es la enfermedad más benigna de las infecciones treponémicas, la transmisión se da por el contacto de heridas expuestas con la persona infectada. La pían se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas que sufren cambios de coloración y que parcialmente alcanzan una despigmentación completa (Meheus, 1996).

Borrelia

Son microorganismos irregulares de 10 a 30 μm de longitud y 0.3 μm de ancho, la longitud entre las espiras varía de 2 a 4 μm . Esta bacteria es transmitida por artrópodos que causan las fiebres recurrentes y la enfermedad de Lyme (Brook *et al.*, 2008).

El género *Borrelia* incluye espiroquetas de mayor tamaño que las treponemas, sobre todo en su diámetro transversal, dotadas de un gran número de fibrillas axiales (Brook *et al.*, 2008).

Las *Borrelia* patógenas del hombre se clasifican en:

- *Borrelia recurrentis* transmitida por piojos (*Pediculus humanus*), agente causal de la fiebre recurrente epidémica.
- *Borrelia duttonii* transmitida por garrapatas del género *Ornithodoros*, agente causal de la fiebre recurrente endémica.
- *Borrelia burgdorferi* transmitida por garrapatas del género *Ixodes*, agente causal de la enfermedad de Lyme. La enfermedad se caracteriza por presentar un cuadro clínico multisistémico con afección de varios órganos como la piel, articulaciones, sistema nervioso central y corazón (Wormser *et al.*, 2006).

Leptospira

La *Leptospira* es una bacteria aeróbica o microaerofílica, miembro del Orden *Spirochaetales*. El nombre deriva de la palabra griega *lepto*, que significa delgada o fina y del latín *spira* que significa espiral (Pumarola *et al.*, 1987).

Leptospira se divide en dos grupos *Leptospira interrogans* que es patógena para el hombre y animales y *Leptospira biflexa* que no es patógena. *Leptospira interrogans* puede sobrevivir días o semanas en el agua con un pH por arriba de 7, un pH ácido destruye con rapidez al microorganismo (Ryan y Ray, 2011).

LEPTOSPIRA

Morfología

Estos organismos tienen forma de espiral, son muy finos, de 5-20 μm de longitud y 0.1-0.5 μm de ancho. Tienden a formar un gancho que se ha diferenciado de otras espiroquetas patógenas. Su visibilidad puede conseguirse mediante microscopía de campo oscuro o de contraste de fases (Jiménez, 2006). La espiroqueta posee una estructura con ganchos en sus extremos, los cuales hacen más sencilla su penetración en los diferentes tejidos y además cuenta con dos flagelos que la proveen de una movilidad característica (Roca, 2006). A continuación se muestra la tabla 2 donde se resumen las principales características de los tres géneros de espiroquetas de importancia clínica.

Tabla 2. Características diferenciales de espiroquetas patógenas.

	<i>Treponema</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Leptospira</i>
Longitud (µm)	5-15	5-30	5-20
Diámetro (µm)	0.2	0.5	0.1
Espiras	Regulares y apretadas (5-20)	Irregulares y amplias (3-10)	Numerosas, regulares y apretadas (30-50)
Extremidades	Afiladas	Afiladas	Incurvadas
Fibrillas	1-5	15-20	2
Observación en fresco	Campo oscuro y contraste de fases	Microscopio ordinario	Campo oscuro y contraste de fases
Tinciones	Impregnación argéntica	Giemsa o Gram	Impregnación argéntica
Cultivo in vitro	No	Si	Si
Condiciones respiratorias	Microaerófilas	Anaerobias	Aerobias
Metabolismo	Fermentativo	Fermentativo	Oxidativo
Especie patógena	<i>T. pallidum</i>	<i>B. recurrentis</i>	<i>L. interrogans</i>
Reservorio	Hombre	Animales y artrópodos	Animales
Enfermedad fundamental	Sífilis, Frambesia, Pinta	Fiebre recurrente Enfermedad de Lyme	Enfermedad de Weil

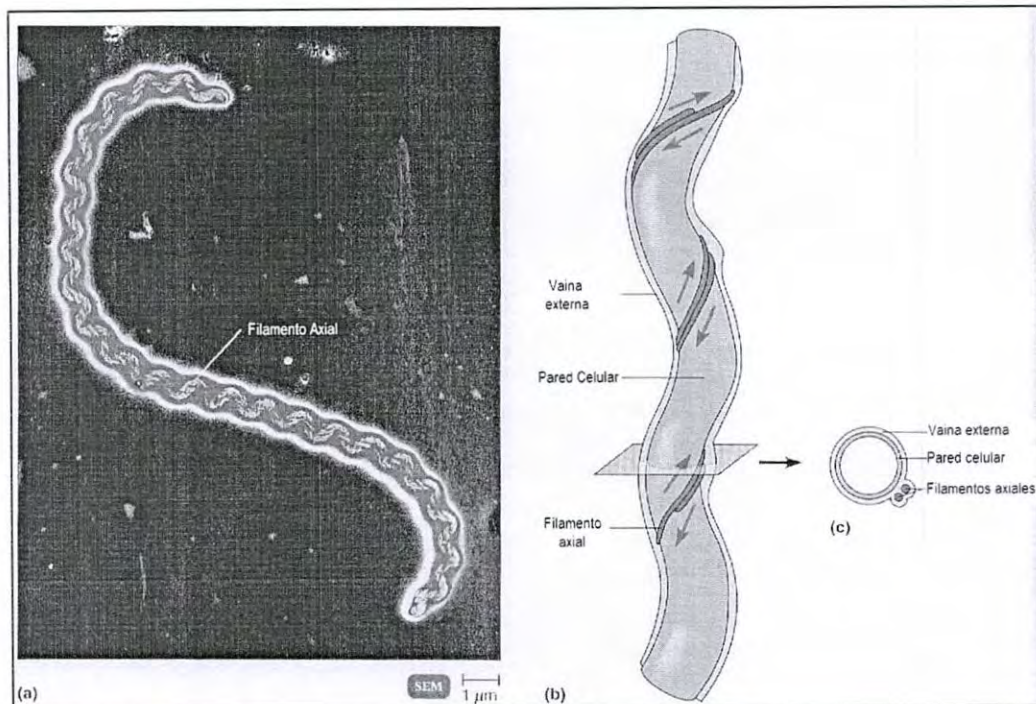
Fuente: Brook *et al.*, 2008.

Estructura

La estructura de *Leptospira* (figura 3) está constituida por: un cilindro protoplasmático, de morfología helicoidal, limitado por una fina capa de peptidoglicano; dos flagelos axiales o periplasmáticos, que se insertan en dos pares de discos, situados en la zona subterminal de cada extremidad, se extienden hacia la parte media y quedan libres sus extremos sin llegar a entrecruzarse; y una membrana externa o envoltura, de estructura trilaminar que los recubre (Pumarola *et al.*, 1987).

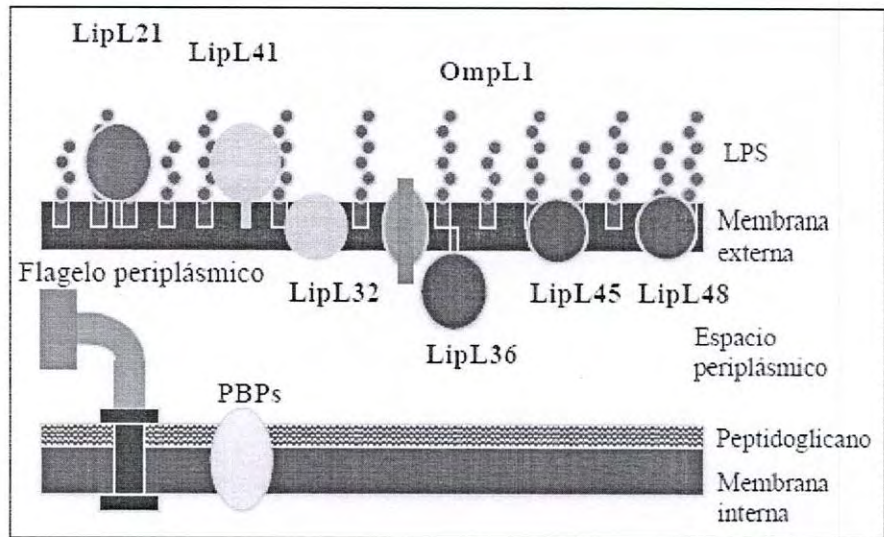
Estructura antigénica

Se han determinado tres tipos de proteínas de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés Outer Membrane Proteins): transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de la membrana (figura 4). Las OMP participan en la patogénesis de la enfermedad, son responsables de la interacción de la espiroqueta con el hospedador y de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Esta espiroqueta posee adhesinas, las cuales, interaccionan con los puntos de fijación de los anticuerpos, porinas que facilitan el transporte de nutrientes, los sideróforos disuelven iones complejos y se convierten en receptores para proteínas y proteínas del complemento (Baquero *et al.*, 2010).



Fuente: Tortora *et al.*, 2003

Figura 3. Filamentos Axiales: a) Micrografía de Leptospira donde se muestra el filamento axial. b) filamentos axiales envolviéndose alrededor de la espiroqueta. c) corte transversal de la espiroqueta mostrando la posición de los filamentos axiales.



Fuente: Jiménez, 2006

Figura 4. Estructura de la membrana celular de *Leptospira*.

Especies del genero *Leptospira*

Este género contiene especies patógenas (tabla 3) y no patógenas para los seres humanos. El método tradicional de clasificación dividió a las *Leptospiras* en aproximadamente 200 serovares basados en las diferencias antigénicas, las *Leptospiras* patógenas fueron clasificadas como una especie, *Leptospira interrogans*; mientras que los serovares de vida libre no patógenos fueron incorporadas en la especie *Leptospira biflexa*. La especie *L. interrogans* acorde a sus propiedades antigénicas, se subdivide a su vez en aproximadamente 180 serotipos. Estos 180 serotipos, por su comportamiento inmunológico, se han dividido en 18 subgrupos. Entre los más comunes se encuentran: *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira autumnalis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira ballum*, *Leptospira bovis*, *Leptospira hebdomadis* y *Leptospira mitis* (McDonough, 2001).

Tabla 3. Principales enfermedades producidas por *Leptospira interrogans*.

<i>Leptospira interrogans</i> serovares	Fuente de infección	Enfermedad en el hombre	Datos clínicos	Distribución
<i>autumnalis</i>	-----	Fiebre pretibial o fiebre del Fuerte Bragg	Fiebre, exantema sobre la tibia	EUA, Japón
<i>ballum</i>	Ratón	-----	Fiebre, erupción, ictericia	EUA, Europa e Israel
<i>bovis</i>	Ganado, ratones silvestres	-----	Fiebre, postración	EUA, Israel, Australia
<i>canicola</i>	Orina de perros	Ictericia infecciosa	Enfermedad gripal, meningitis aséptica	Universal
<i>grippotyphosa</i>	Roedores, agua	Fiebre de los pantanos	Fiebre, postración, meningitis aséptica	Europa, EUA, Africa
<i>hebdomadis</i>	Ratas, ratones	Fiebre de los siete días	Fiebre, ictericia	Japón, Europa
<i>icterhemorrhagiae</i>	Orina de ratas	Enfermedad de Weil	Ictericia, hemorragias, meningitis aséptica	Universal
<i>mitis</i>	Cerdos	Enfermedad de los porquerizos	Meningitis aséptica	Australia
<i>pomona</i>	Cerdos, ganado	Enfermedad de los porquerizos	Fiebre, postración, meningitis aséptica	Europa, EUA, Australia

Fuente: Brook *et al.*, 2008.

LEPTOSPIROSIS

Síndrome Febril inespecífico

El término síndrome febril inespecífico o también llamado 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 y en la que no se llega a un diagnóstico a pesar de un estudio de una semana con el enfermo hospitalizado.

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, las cuales se muestran en la tabla 4 (Fauci *et al.*, 2008).

Tabla 4. Causas distintas asociadas etiológicamente al síndrome febril inespecífico.

Enfermedades bacterianas	Enfermedades autoinmunes	Enfermedades neoplásicas
• Brucelosis.	• Fiebre reumática.	• Linfoma de Hodgkin.
• Legionelosis.	• Artritis reumatoide.	• Leucemia.
• Listeriosis.	• Lupus eritematoso sistémico.	• Granulomatosis linfomatoide.
• Salmonelosis.	• Enfermedad mixta del tejido conjuntivo.	• Cáncer de páncreas.
• Fiebre tifoidea.	• Polimialgia reumática.	• Sarcoma.
• Fiebre Q.	• Eritema multiforme.	• Carcinoma de células renales.
• Mycobacterium tuberculosis.	• Eritema nudoso.	• Carcinoma de vesícula.
• Rickettsiosis.	• Poliarteritis nudosa.	• Linfomas de células T inmunoblásticas.
• Leptospirosis.	• Enfermedad mixta del tejido conjuntivo.	• Cáncer de colon.
• Sífilis.		
• Borreliosis.		

Fuente: Modificado de Fauci *et al.*, 2008.

Enfermedad por *Leptospira*

La leptospirosis a nivel mundial tiene una variedad de nombres tales como: síndrome de Weil, enfermedad de los sembradores de págala, enfermedad de los pantanos, fiebre otoñal, ictericia hemorrágica, enfermedad de los porquerizos, fiebre de los cañaverales, fiebre de los arrozales, entre otros, fue descubierta por Weil en 1886, mismo que describió la sintomatología clásica. En los humanos los síntomas de la leptospirosis incluyen fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolor muscular, vómitos, diarrea y algunas veces irritación de la piel ("rash"). La afección es producto de la infección por diversos serotipos del género *Leptospira*. Es considerada una de las principales enfermedades zoonóticas debido a que tienen una distribución mundial (Dammert, 2005).

La espiroqueta por lo general se aloja en los riñones del reservorio (en los reservorios es muy poco frecuente la expresión patógena), posteriormente las bacterias son excretadas por medio de la orina (WHO, 2008). En su forma más común la leptospirosis adopta el aspecto clínico de un síndrome febril anictérico (CDC, 2005).

La segunda fase presenta las características de la fase inmune y se correlaciona con la aparición de anticuerpos circulantes de clase IgM. En 5-10% de los casos se presentan ictericia (hay amarillamiento de la piel y los ojos), manifestaciones hemorrágicas e insuficiencia renal aguda, las bilirrubinas se elevan por arriba de 15 mg/dl, en tanto que las transaminasas pirúvica y oxalacética se encuentran ligeramente elevadas. A esta fase de la leptospirosis se le conoce como la

enfermedad de Weil. El tiempo que tarda una persona en sentir los primeros síntomas desde que contrae la bacteria es de 2 días hasta 4 semanas, pero generalmente los síntomas aparecen en unos 10 días. Si no se trata a tiempo, una persona infectada puede sufrir daños en los riñones y en el hígado, meningitis y dificultad para respirar. La leptospirosis perdura desde unos pocos días hasta 3 semanas o más. Sin tratamiento la recuperación puede tomar varios meses (CDC, 2005).

Un gran número de enfermedades deben considerarse como diagnósticos diferenciales con leptospirosis, entre las que se cuenta influenza, malaria, meningitis aséptica, toxoplasmosis, fiebre tifoidea, hepatitis A, rickettsiosis, dengue y fiebre hemorrágica entre otros. Una asociación de leptospirosis y dengue ha sido ampliamente documentada en diferentes regiones del mundo y algunas veces coincidiendo algunas veces con desastres naturales (McBride *et al.*, 2005).

Etiología

En 1915 Inada e Ido pudieron describir que la rata era un reservorio debido a que cultivaron el microorganismo por vez primera, así mismo el agente etiológico de la leptospirosis fue descubierta en Japón y Alemania en la sangre de un grupo de mineros y soldados, respectivamente, cuando se observó la existencia de espiroquetas y la producción de anticuerpos específicos contra la misma bacteria (Lemarroy y Carrillo, 2003). El primer caso reportado en seres humanos llegó hasta 1922 por Eodsworth (Dammert 2005).

Epidemiología

La epidemiología está determinada por factores ecológicos tales como el clima y la naturaleza de sus reservorios (Vado *et al.*, 2002). Una mayor incidencia de la enfermedad ocurre en suelos con pH alcalino, durante las estaciones húmedas (áreas de alta precipitación), en áreas bajas donde es susceptible que la lluvia corra, climas cálidos y húmedos, áreas con abundante superficie de agua generando campos pantanosos y áreas barrosas (McDonough, 2001; Acosta *et al.*, 1994).

La Leptospirosis afecta a numerosas especies animales, salvajes y domésticas, que son el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Los más afectados son los roedores salvajes, perros, vacas, cerdos, caballos y ovejas. La leptospirosis establece una relación de simbiosis con el hospedador y a veces persisten durante años en el túbulo renal (SINAVE, 2012).

La epidemiología en humanos se da mediante contacto directo o indirecto de la persona con el animal infectado, la infección indirecta se da cuando el hombre tiene contacto con agua o tierra contaminada. En el suelo mojado la bacteria *Leptospira* sobrevive aproximadamente tres meses. Los animales silvestres y las mascotas infectadas pueden permanecer arrojando la bacteria en el medio ambiente por meses o hasta varios años.

Por otro lado, la infección directa es adquirida por contacto con sangre, orina infectada, descargas uterinas, material o fluidos fetales y placentarios. Es una enfermedad con clara vinculación ocupacional, asociada a actividades que favorecen el contacto con los animales o sus productos: veterinarios, criadores de animales, empleados de mataderos, trabajadores rurales de zonas de humedales (arroceras y caña de azúcar), granjeros, trabajadores de alcantarillados, hurgadores de residuos, entre otros. En el área urbana, los grupos poblacionales más vulnerables son aquellos con precarias condiciones de vivienda, sin saneamiento, expuestos a mayor contacto con roedores. Es un riesgo potencial para militares, bañistas, deportistas, personas que acampan al aire libre en zonas infectadas o que participan en competencias deportivas de sobrevivencia (Solano *et al.*, 1996).

Numerosos factores ambientales intervienen en la reemergencia de enfermedades como la leptospirosis: los cambios climáticos, en particular las intensas lluvias, el crecimiento demográfico con urbanización descontrolada hacia zonas periféricas sin saneamiento, presencia de basurales, criaderos de clandestinos de animales, construcción de viviendas precarias en terrenos inundables que llevan a trasladar la presencia de *Leptospira* a zonas suburbanas e incluso urbanas (Gamarra, 2009).

El número de casos de leptospirosis a nivel mundial no está bien documentado. Esta enfermedad es más común en lugares tropicales. Sin embargo, la incidencia está incrementándose en áreas urbanas con bajos niveles sanitarios. De acuerdo con reportes disponibles, la incidencia anual varía aproximadamente de 0.11 por 100 000 en climas templados hasta 10 -100 por 100,000 habitantes en climas húmedos tropicales (SINAVE, 2012).

En México al igual que a nivel mundial existe un subregistro de casos debido a que: el diagnóstico es difícil de confirmar, puede ser confundida con otras enfermedades o la enfermedad puede ser leve y no ser investigada en el laboratorio. El panorama epidemiológico de la Leptospirosis en México en el 2000 presentaba una tasa de incidencia del 0.65 y al 2010 disminuyó a 0.45 número de casos por cada 100,00 habitantes. En la figura 5 se muestra la incidencia de leptospirosis en los estados de la república mexicana, tales como: Hidalgo, Sinaloa, Veracruz, Tabasco, Sonora y Yucatán, que oscilan entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100,000 habitantes (SINAVE, 2012).



Fuente: Caro Lozano *et al.*, 2010

Figura 5. Estados reportados con leptospirosis en México en el periodo 2003-2008.

Patogenia

La penetración de la bacteria puede darse a través de una herida expuesta, así como también por la mucosa: ocular y nasal principalmente, no muy frecuentemente la piel íntegra sirve como puerta de entrada, salvo que la exposición con agua sea prolongada. La movilidad que el microorganismo posee, así como su hialuronidasa lo hacen capaz para penetrar a través de los tejidos. Después de la penetración por la piel, la *Leptospira* patógena, invade el torrente sanguíneo y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el sistema nervioso central (SNC) y el humor acuoso. Parece ser que existe tropismo por algunos órganos como el hígado, riñones, corazón y músculo esquelético (Gamarra, 2009).

Se piensa que toxinas y enzimas producidas por la *Leptospira* contribuirían en su patogenicidad, más estas hasta ahora no han sido aisladas. Los síntomas clínicos y la anatomopatología de esta enfermedad sugieren la presencia de una endotoxina (Gamarra, 2009).

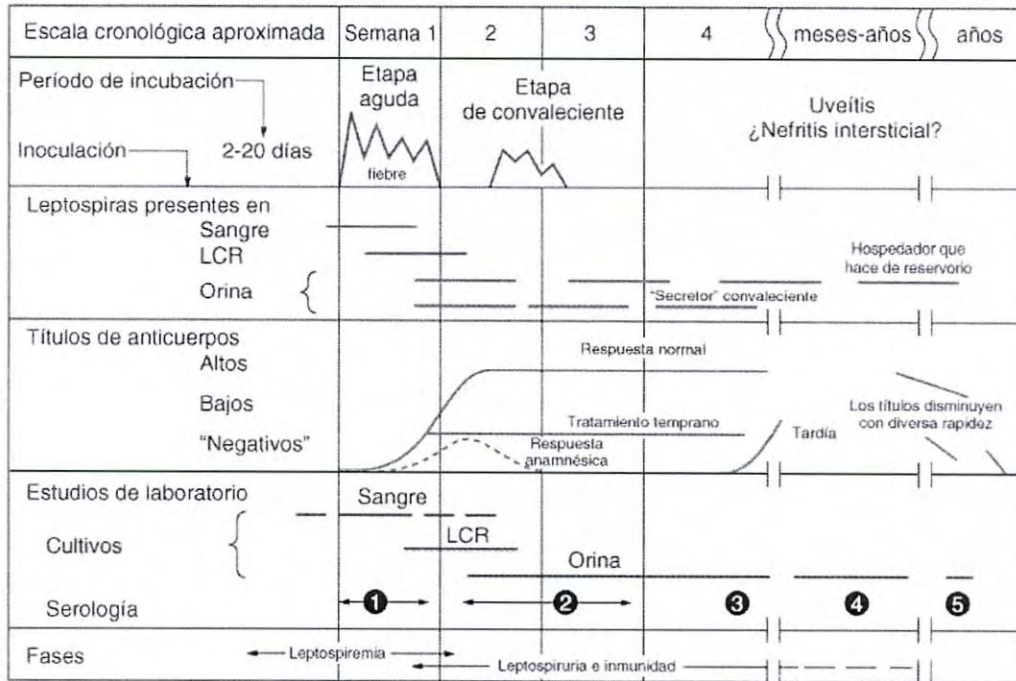
La sintomatología de esta enfermedad sugiere la presencia de una endotoxina. Los procesos físicos y químicos de la enfermedad no son muy conocidos y posiblemente corresponda al acto directo del microorganismo y las toxinas elaboradas después de la lisis, o sea, apoyada a la lesión capilar seguida de la falta de oxígeno en algún tejido (Gamarra, 2009).

Signos clínicos

La manera más común en que se presenta esta enfermedad es subclínica, es decir, la forma anictérica. En la minoría se presenta en forma severa con ictericia. El período de desarrollo se encuentra entre 2 y 26 días, teniendo un promedio de 10 días. La leptospirosis puede darse tanto en la forma ictérica como anictérica (Solano *et al.*, 1996). En la figura 6 se muestran las diferentes fases de la Leptospirosis y los principales estudios.

La primera fase comprende un periodo de entre 4 a 7 días, posteriormente le sigue una fase inmune la cual tiene una duración de 4 a 30 días. En esta etapa es posible lograr aislar las *Leptospiras* de sangre, líquido cefalorraquídeo y en casi todos los tejidos. En la segunda fase, la espiroqueta ya no está presente en los lugares anteriormente citados, ahora pasaran a encontrarse en la orina y humor acuoso, esta etapa se caracteriza, por la aparición de meningitis, uveítis, erupciones cutáneas tales como exantemas y en casos más graves puede dañar al hígado y riñones (Solano *et al.*, 1996).

La Leptospirosis se caracteriza por tener fiebre alta, cefalea, mialgias, dolor abdominal, malestar general y astenia, estos signos clínicos corresponden a la forma leve de la enfermedad, durando de 4 a 7 días (Caro Lozano *et al.*, 2010).



Fuente: Fauci *et al.*, 2008.

Figura 6. Naturaleza bifásica de la leptospirosis y estudios importantes.

Prevención y control

Debido a la gran gama de serovares, raíz de la infección y las variadas circunstancias de transmisión, el control de la leptospirosis es difícil y dependerá de las condiciones locales. Para prevenir la enfermedad se puede intervenir al reservorio o bien reduciendo el contagio de animales reservorio (Sandoval, 2010).

Las diferentes medidas de prevención están fundamentadas en el conocimiento de aquellas personas que tengan mayor grado de exposición de contraer la infección y las causas epidemiológicas del sitio de trabajo. Las personas mayormente afectadas son; ganaderos, agricultores, veterinarios, y personal de laboratorio. El control y la prevención deben estar dirigidos a: 1) la causa de contaminación; 2) la manera de transmisión entre la causa de contaminación y el huésped humano y 3) la contaminación o la enfermedad en el humano (Sandoval, 2010).

MÉTODOS GENERALES DE IDENTIFICACIÓN

Cultivo

Las muestras deben ser inoculadas en medios de cultivo semisólidos, como el medio Fletcher enriquecido con suero de conejo. Existen otros medios de cultivo desarrollados, que son apropiados para el aislamiento de *Leptospira* tales como: medio EMJH (Ellinghausen y Mecullough, modificado por Johnson y Harries) y el medio Tween 80-albúmina, algunos de estos se muestran en la tabla 5, siendo este último considerado el más apto (Dammert, 2005).

Estas bacterias requieren de condiciones aerobias para crecer y una temperatura de entre 28 a 30°C. Su crecimiento de forma normal es de 7 a 14 días en medios líquidos y con un tiempo de generación de 7 a 18 horas (Dammert, 2005).

Debido a que las *Leptospiras* tienen como desventaja un crecimiento muy lento en el cultivo, no debe ser utilizado para dar un tratamiento inicial. Estudios reportaron un procedimiento radiométrico rápido que emplea el sistema BATEC-460; con este sistema la *Leptospira* se puede demostrar en sangre en un periodo de 2 a 5 días después de la enfermedad (Dammert, 2005).

Tabla 5. Principales medios de cultivo para *Leptospira*.

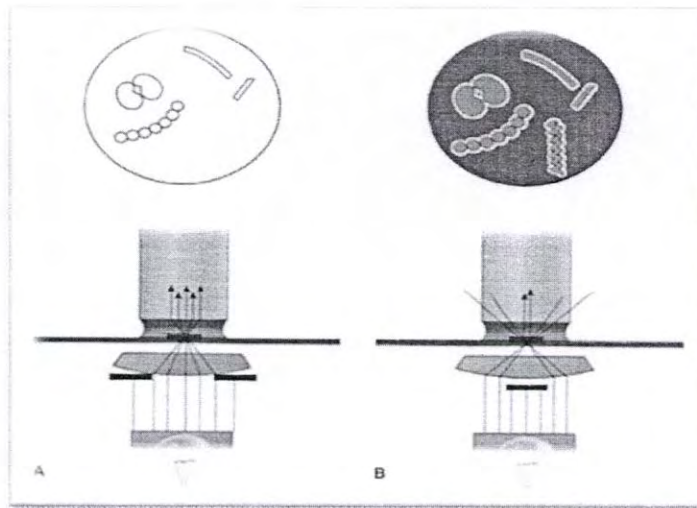
Medio de cultivo	Estado del medio	Crecimiento
EMJH	Líquido	Presenta turbidez
Fletcher	Semisólidos	Disco blanco lineal por debajo de la superficie del medio
Cox	Sólidos	Presenta colonias translúcidas.

Fuente: Ginebra González, 2001.

Microscopia de campo oscuro

El microscopio de campo oscuro es una modificación al sistema de campo claro que consiste en bloquear los rayos centrales que alcanzan al condensador, por medio de un disco, de tal manera que el cono iluminador es un cono hueco de luz, con mayor apertura numérica que el objetivo (Martínez, 1988).

Las mismas lentes del objetivo y oculares utilizadas en los microscopios de campo brillante se utilizan en los microscopios de campo oscuro la única diferencia es que se incluye un condensador especial que impide que la luz transmitida ilumine directamente la muestra, como se puede observar en la figura 7. Únicamente la luz oblicua y diseminada alcanza la muestra y pasa al interior de los sistemas de lentes, lo que hace que se vea iluminada brillantemente contra un trasfondo negro, lo que permite detectar bacterias extremadamente delgadas, como *Leptospira*, *Treponema Borrelia* y (Murray *et al.*, 2006).



Fuente: Modificado de Ryan y Ray, 2011.

Figura 7. Diferencia entre el microscopio de campo claro y campo oscuro.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sencilla, en la cual un molde de ADN o ARN es amplificado millones de veces, de una manera rápida y fiable. Se amplifica solo una parte de un ácido nucleico de interés.

El proceso de la PCR es extremadamente sensible y requiere pocas cantidades del genoma, es imprescindible conocer "a priori" la secuencia del gen que se quiere amplificar. Otra de sus propiedades es su versatilidad, debido a que la muestra que se desea amplificar puede ser pura o ser una mínima parte de una mezcla extremadamente compleja de materiales biológicos.

Los ciclos se logran encadenar, cada uno consta de tres fases: 1) fusión de la doble hélice de ADN conteniendo la secuencia a amplificar, 2) hibridación con la pareja de primers específicos y 3) elongación de las cadenas nacientes, por medio de la ADN-polimerasa (Williams, 1990; Mullis, 1986).

Técnica de microaglutinación (MAT)

La técnica de microaglutinación consiste en detectar anticuerpos IgG e IgM utilizando antígenos vivos. Esta técnica consiste en enfrentar diluciones sucesivas del suero del paciente sospechoso, a un serovar o grupo de serovares seleccionados de la bacteria inactivada. Las ventajas de esta técnica es que es muy sensible y fiable permitiendo la determinación cualitativa y cuantitativa de los anticuerpos en suero.

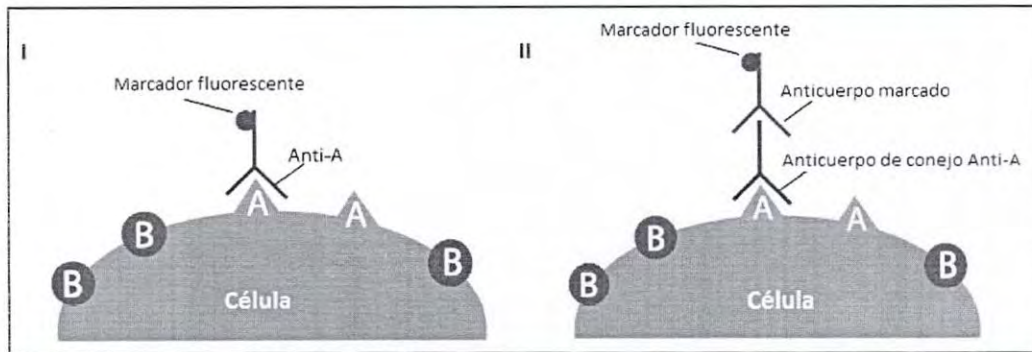
Esta técnica es empleada para la detección de anticuerpos en suero, las bacterias utilizadas como antígenos son los serovares más comunes en el área de estudio. La OMS recomienda que por lo menos en las regiones en las cuales se desconoce los serovares circulantes, se utilice una cepa de referencia de los serovares representativos de las especies frecuentes (Céspedes y Glenny, 2002).

El método consiste en mezclar el suero de conejo con anticuerpos contra *Leptospira*, haciendo a este reaccionar con el plasma del paciente, al hacer esto se observa una precipitación. Para considerar positiva en su máxima dilución la cual es cuando se aglutina el 50% o más del antígeno, debiendo ser observado en microscopio de campo oscuro a 100 aumentos (Jiménez, 2006; WHO, 2008).

Inmunofluorescencia (IFA)

Albert Coons (1944) demostró que se puede marcar anticuerpos mediante fluorescencia. Las moléculas que tienen como características la fluorescencia tienen propiedades de absorber y emitir luz de una longitud de onda, la luz que es emitida se observa mediante un microscopio de fluorescencia (Kindt *et al.*, 2007).

La microscopia de inmunofluorescencia (figura 8) es una técnica inmunohistoquímica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína) con anticuerpos o antígenos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos en capa única. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz ultravioleta se producirá fluorescencia observable bajo el microscopio de inmunofluorescencia (Abbas *et al.*, 2008).



Fuente: Koivunen y Krogsrud, 2006.

Figura 8. Prueba de anticuerpos fluorescentes directos (I) se usan anticuerpos que reconocen antígenos específicos en la superficie celular. En el formato de prueba indirecto (II), la detección se basa en un secundario (anti-especie) anticuerpo conjugado con un marcador fluorescente.

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, por sus siglas en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), como sus siglas lo indican utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Esta técnica tiene una gama muy amplia de antígenos reactivos, la prueba es utilizada para la detección de anticuerpos IgG e IgM (Fauci *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2008).

El antígeno que se utiliza en esta prueba es ampliamente reactivo de *Leptospira*. La prueba es positiva para las inmunoglobulinas IgG e IgM en un lapso de 4 a 5 días posteriores al comienzo de la enfermedad (Fauci *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2008).

Se cuenta con algunas variantes de ELISA (figura 9) que permite la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígenos o anticuerpos.

ELISA indirecto

Pueden detectarse anticuerpos de manera cuantitativa. Se usan placas de poliestireno que contienen pocillos, los cuales se cubren con el antígeno deseado. Se añade el suero en estudio y, si contiene anticuerpos específicos, estos se combinan con el antígeno presente en la fase sólida. El material que no reacciona se elimina mediante lavados y los pocillos se tratan con un segundo anticuerpo antiinmunoglobulina marcado con una enzima, que se une al anticuerpo que ha reaccionado con el antígeno en la placa, después de un periodo de incubación se somete a lavados, por último se agrega un sustrato que reacciona con la enzima

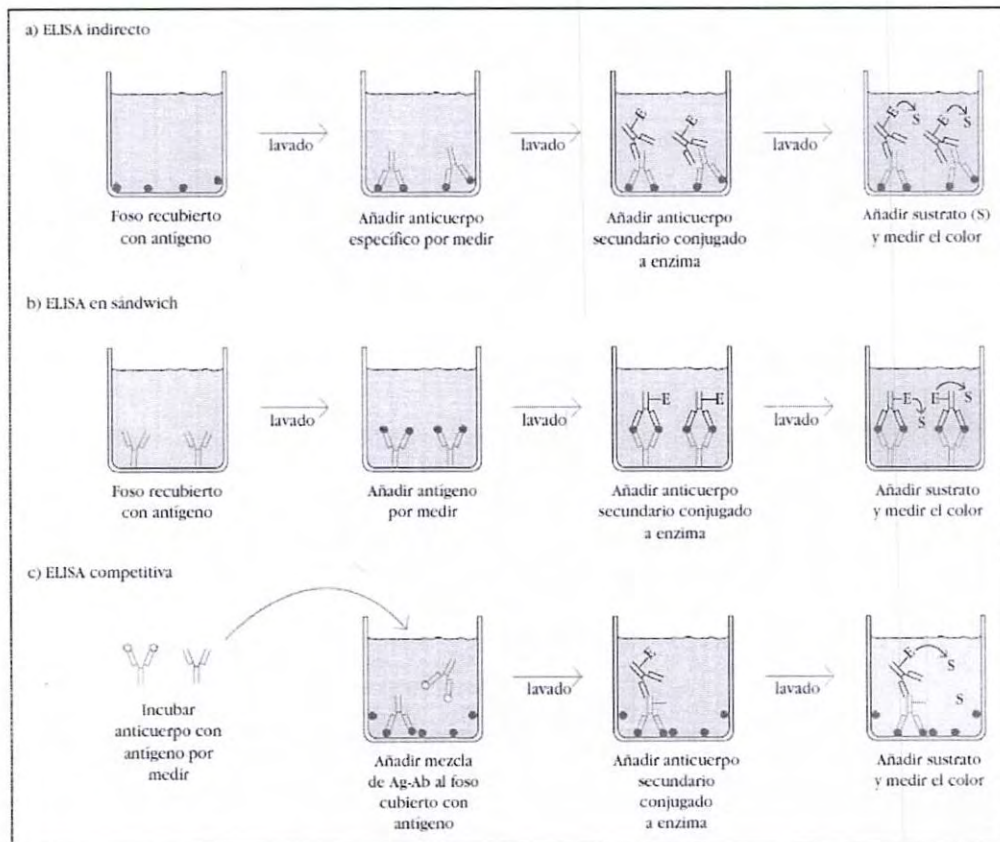
enlazada y genera un producto colorido (Zambrano, 2007; Terr *et al.*, 1998; Kindt *et al.*, 2007).

ELISA directo

Esta variante del ELISA ayuda para medir cantidades de antígeno. Se incubaba primero anticuerpo en solución con una muestra que contiene antígeno. Después la mezcla se añade a un foso de microtitulo recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario con la enzima específica para el isotipo de un anticuerpo primario puede utilizarse para determinar la cantidad de anticuerpos primarios unidos al foso (Zambrano, 2007; Terr *et al.*, 1998; Kindt *et al.*, 2007).

ELISA sándwich:

Permite detectar o medir antígenos. En esta técnica, el anticuerpo se inmoviliza en un foso de microtítulo. Se añade una muestra que contiene antígeno y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Después de una serie de lavados se agrega un segundo anticuerpo ligado a una enzima específica para un epitopo distinto del antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido. Por medio de lavados se elimina cualquier segundo anticuerpo libre, se añade un sustrato y se mide el producto mediante un espectrofotómetro (Zambrano, 2007; Terr *et al.*, 1998; Kindt *et al.*, 2007).



Fuente: Kindt *et al.*, 2007.

Figura 9. Variaciones de la técnica ELISA a) ELISA indirecto b) ELISA en sándwich c) ELISA directo.

CARACTERÍSTICAS DE ANTÍGENOS E INMUNOGLOBULINAS

Antígenos

Al hablar de antígenos tenemos que hacer mención de otro término llamado inmunógeno, y la relación estrecha que existen entre ellos (Kindt *et al.*, 2007).

Anteriormente la definición de antígeno era aquella molécula capaz de producir una respuesta inmunitaria y reaccionar con los productos de esta. Hoy en día la definición ha cambiado por lo que el término antígeno es aquella molécula que reacciona de manera específica con un anticuerpo o con los receptores de una célula sensibilizada mientras que un inmunógeno es cualquier sustancia capaz de producir una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, un antígeno difiere de un inmunógeno debido a que puede reaccionar de forma específica pero no puede inducir una respuesta inmunitaria. En otras palabras todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos (Kindt *et al.*, 2007).

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son un grupo de glicoproteínas localizadas en el suero y líquidos corporales, fundamentales en las diferentes etapas de la respuesta inmunológica. Las inmunoglobulinas se forman como producto de la interacción de un linfocito B maduro y un antígeno. Los linfocitos B reconocen al antígeno por medio de receptores de superficie que se caracterizan por poseer una alta especificidad; una vez que lo enlazan, proliferan a células plasmáticas que a su vez producirán una gran cantidad de anticuerpos (Zambrano, 2007; Terr *et al.*, 1998).

Estructura de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas están formadas por un par de cadenas pesadas y un par de cadenas ligeras ambas idénticas, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por medio de un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes (figura 10) (Kindt *et al.*, 2007).

La estructura de las inmunoglobulinas fue descubierta en 1950 por los estudios de Edelman y Poster en el cual sometían a digestión enzimática la molécula de IgG con ayuda de papaína la cual producía dos fragmentos Fab (fragmentos combinantes del anticuerpo) y uno denominado Fc (fragmento cristalizante). Las porciones Fab están formadas por regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Estas dos porciones contienen los dos sitios de combinación de anticuerpos en el cual se enlazan los antígenos. La porción Fc contiene las regiones constantes de las

cadena pesada y presenta funciones como la de activar al complemento, adherirse a células o tejidos y atravesar placenta (Kindt *et al.*, 2007).

Tipos y función de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas se encargan de realizar reacciones inmunológicas, existen 5 tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007)

Inmunoglobulina G (IgG)

La IgG es un anticuerpo encargado de la respuesta inmune secundaria o de memoria con un tiempo de vida media de 23 días aproximadamente, misma que consta de 4 subclases, a las cuales solo se les agrega el número correspondiente: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgG abarca un 80% del total de las tipos de inmunoglobulinas además es capaz de atravesar la placenta (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007).

Inmunoglobulina M (IgM)

La IgM representa del 5 a 10% de todas las inmunoglobulinas y posee una vida media de 5 días. Es el primer anticuerpo en formarse en una respuesta inmunológica, es la encargada de la respuesta inmediata consecuente a una infección (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007).

Inmunoglobulina A (IgA)

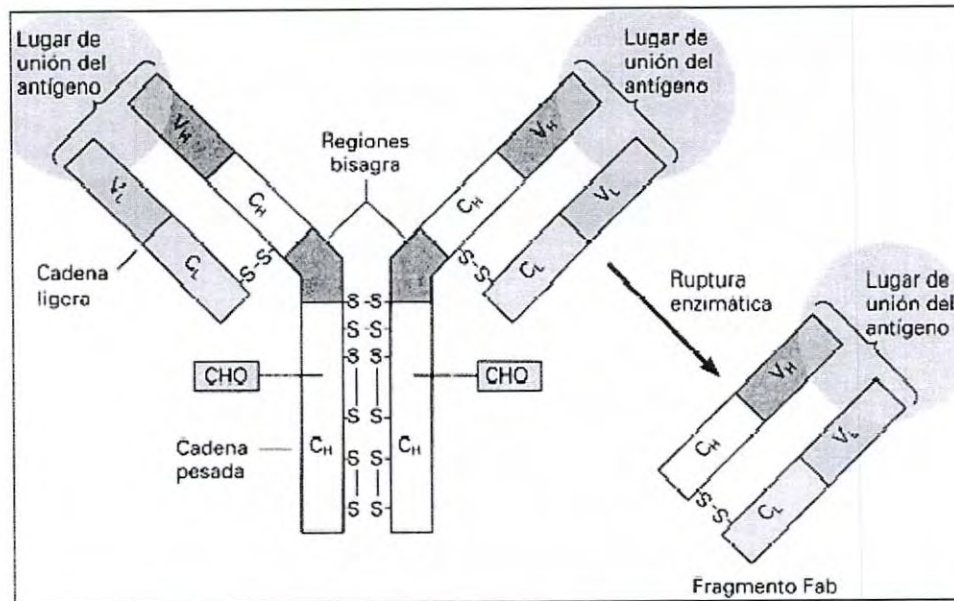
Esta inmunoglobulina se encuentra de un 5 a 15 % del total de las inmunoglobulinas con un tiempo de vida media de 6 días aproximadamente. La IgA se encuentra principalmente en secreciones, tales como la saliva y las lágrimas; protegiéndonos de esta manera de microorganismos que suelen invadir nuestro organismo a través de membranas mucosas externas (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007).

Inmunoglobulina D (IgD)

La función de la IgD en cuanto a la respuesta inmunitaria es desconocida y solo proporciona menos del 1% del total de las inmunoglobulinas con una vida media de 2 a 3 días aproximadamente; puede ser encontrada junto con la IgM en la pared celular de los linfocitos B (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007).

Inmunoglobulina E (IgE)

Es la inmunoglobulina que se encuentra en menor cantidad con una vida media de 2 días aproximadamente. Son responsables de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Mckenzie *et al.*, 2009; Zambrano, 2007).



Fuente: Matthews y van Holde, 1998.

Figura 10. Diagrama esquemático de la estructura de las inmunoglobulinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio y tamaño de muestra

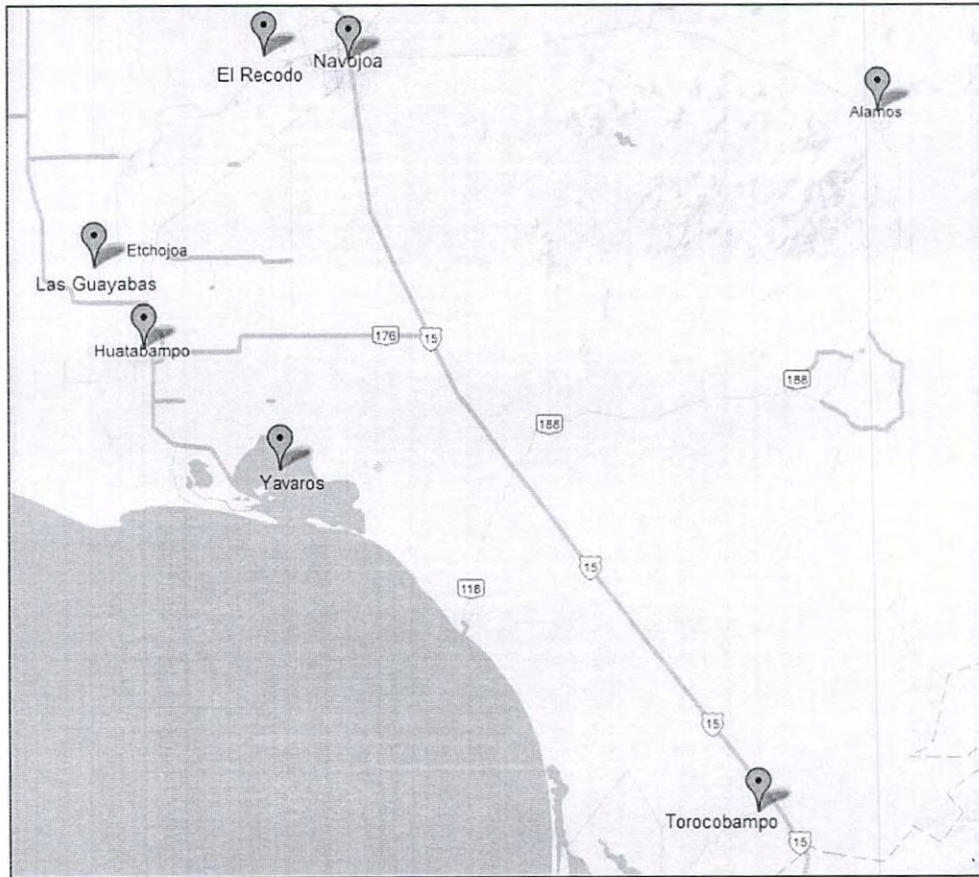
El análisis de la población se realizó en los diferentes centros de salud adscritos a la Jurisdicción Sanitaria No. V de Navojoa, Sonora. Comprendieron los Municipios de Álamos, Etchojoa, Huatabampo y Navojoa, así como también, Las Guayabas Etchojoa, Torocobampo Huatabampo, Yavaros Huatabampo y El Recodo Navojoa (figura 11). Se estudiaron un total de 137 pacientes que acudieron por atención médica a los diferentes centros de salud del 17 de enero al 30 de octubre del 2012.

Criterios de Inclusión

1. Pacientes que después de ser valorados clínicamente presentan síndrome febril inespecífico.
2. Pacientes con síndrome febril inespecífico que firmen su carta de consentimiento informado.

Criterios de Exclusión

1. Pacientes con cuadros febriles identificables etiológicamente.
2. Pacientes que no acepten participar en el estudio.



Fuente: Google maps, 2013.

Figura 11. Zona de investigación en el sur del estado de Sonora.

Diagnóstico de Síndrome Febril Inespecífico

La elección de los pacientes correspondió al diagnóstico clínico del síndrome febril inespecífico. Para ello, se realizó la exploración física e interrogatorio del paciente, la figura 12 muestra el formato de registro médico de los pacientes cuyos signos correspondieron al síndrome febril inespecífico.

Toma de muestra y Transporte

A los pacientes con síndrome febril inespecífico que aceptaron participar en el estudio (figura 13), estando en ayunas se realizó la extracción de sangre periférica utilizando tubos de ensaye con y sin anticoagulante EDTA (figura 14). Las muestras fueron recolectadas en los diferentes centros de salud en un horario de 7:00 a 11:00 am. Las muestras se trasladaron en un recipiente cerrado que contenía refrigerante para mantener la temperatura de 4 a 8°C, colocadas verticalmente en una gradilla. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades Tropicales (LIZET) ubicado en la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur.

Procedimiento de extracción de muestra sanguínea

- El paciente sentado en la silla de toma muestra y con el brazo extendido en una superficie fija, se le colocó el torniquete a una distancia entre 7-10 centímetros por encima del lugar donde realizó la punción.
- Se desinfectó la zona de la punción con alcohol.
- Se realizó la búsqueda de la vena más adecuada.
- Se aseguró la aguja en el sistema vacutainer (chaqueta) y se colocaron los tubos (Rojos y Lilas, con y sin EDTA, respectivamente) al alcance.
- Se inmovilizó la vena seleccionada colocando el pulgar bajo la zona de punción; se introdujo la aguja a la vena, asegurándose que el bisel estuviera hacia arriba.
- Una vez seguro de que se puncionó la vena correctamente se colocaron con cuidado los tubos en la chaqueta vacutainer uno por uno, teniendo cuidado de no empujar la aguja más adentro.
- Se retiró el torniquete y posteriormente se retiró la aguja y al mismo tiempo se colocó una torunda y se le pidió al paciente doblar el brazo por 5 minutos para asegurar una coagulación rápida en la zona de punción.



LABORATORIO DE INVESTIGACION
ZONOSIS Y ENFERMEDADES TROPICALES
DE LA REGION DEL MAYO



EL SABER DE ANCHOS
HACER LA GRANDEZA

FECHA: _____

NO. DE MUESTRA: _____

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

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES _____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES NO PATOLÓGICOS: _____

VIVIENDA: _____

CONTACTO C/ ANIMALES: PERROS, GATOS, RATONES, GANADO: _____ CERDOS, AVES: _____

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES: _____

AGUA: ENTUBADA TINACO CISTERNA BOTES OTROS: _____

CUADRO CLINICO

PIEBRE <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"/>
DIAPHORESIS <input type="checkbox"/>	METEORISMO <input type="checkbox"/>	PERDIDA DE LA MEMORIA <input type="checkbox"/>
ASTENIA <input type="checkbox"/>	DISTENSION ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	CONFUSION 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 CUTANEA <input type="checkbox"/>	EDEMAS <input type="checkbox"/>
FOTOFOBIA <input type="checkbox"/>	FATIGA FACIL <input type="checkbox"/>	SOMNOLENCIA DIURNA <input type="checkbox"/>
CONGESTION CONJUNTIVAL <input type="checkbox"/>	DISNEA DE ESFUERZO <input type="checkbox"/>	INSOMNIO <input type="checkbox"/>
DISMINUCION 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"/>	DEPRESION <input type="checkbox"/>
PALPITACIONES <input type="checkbox"/>	EQUIMOSIS <input type="checkbox"/>	CUADRO PSICOTICO <input type="checkbox"/>
ARTRALGIA <input type="checkbox"/>	SANGRADO <input type="checkbox"/>	TIPO MEDICAMENTO <input type="checkbox"/>
DOLOR DE ESPALDA ALTA <input type="checkbox"/> MEDIA <input type="checkbox"/> BAJA <input type="checkbox"/>		

Fuente: Caro *et al.*, 2010; Velasco *et al.*, 2009; Fauci *et al.*, 2008; Levett 2001.

Figura 12. Formato de registro médico.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Navojoa, sonora a los ____ días del mes de _____ del año 20__

El (la) suscrito, de nombre: _____,

Por este conducto, hace constar que da su autorización para participar como paciente el estudio denominado: "DETECCIÓN DE ESPIROQUETAS EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL INESPECÍFICO DEL SUR DEL ESTADO DE SONORA", dando las facilidades para el interrogatorio, llenado de cuestionario, disponibilidad de resultado de laboratorio e información de tratamiento, necesario para el cumplimiento y culminación de dicho estudio, así mismo le informo que el nombre y datos del paciente quedaran en anonimato.

Todos los datos obtenidos serán empleados para la realización de la tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Biólogo Clínico por los alumnos: Guadalupe Abel Gaz Vega y Daphné Sinaí Anduro Castro con número de expediente: 208200062 y 208200678 respectivamente, de la UNIDAD REGIONAL SUR.

Dra. Norma Patricia Adan Bante

Responsable de la investigación

Nombre y Firma

Paciente

Figura 13. Carta de consentimiento.



Figura 14. Extracción de muestra sanguínea.

Separación de la muestra

Las muestras se dejaron reposar durante 20 minutos, para que se llevara a cabo la separación de sus componentes; fueron centrifugados a 2400 rpm/10 minutos (Fisher Scientific modelo 225). Se realizó la separación del suero en tres tubos de eppendorf con capacidad de 2 ml con técnica aséptica de los cuales dos se guardaron a -80°C para futuras pruebas (PCR y Western Blot) y uno se utilizó para su posterior titulación de anticuerpos por el método de ELISA indirecto.

Observación en el microscopio de campo oscuro

La observación microscópica se realizó por el método de Velasco-Castrejón *et. al.*, 2007 con algunas modificaciones. Se utilizó el tubo que contenía el remanente de suero y fracción coagulada, se recolectó 50 µl de la fracción intermedia y fue depositado en el portaobjetos.

Para la observación de la muestra en fresco se utilizó un microscopio de campo oscuro (Carl Zeiss Axiostarplus) conectado a una videocámara (Sony Handycam Modelo: DCR-SR68) y un monitor de alta resolución (Samsung Full HD). La interpretación de los resultados, se realizó por el método de Fajardo *et. al.*, 1998 con las siguientes modificaciones. Se consideraron positivas todas aquellas muestras que tras ser observados 20 campos se pudieron apreciar clara y definitivamente de 10 a 12 espiroquetas compatibles a *Leptospira*.

Detección de anticuerpos contra *Leptospira*

La detección de anticuerpos contra *Leptospira* de tipo IgG e IgM se llevó de acuerdo a las especificaciones del kit ELISA comercial (marca Diagnostic Automation, INC. *Leptospira* IgG e IgM). Se incluyeron controles positivos y negativos los cuales permitieron validar la estabilidad del kit. A continuación se describe la metodología empleada para cada estudio.

Preparación de la muestra y reactivos

- Todos los reactivos y muestras fueron puestos a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Al realizar el ensayo, se evitó la formación de burbujas en los pocillos. Las burbujas pueden afectar el rendimiento y la lectura de los resultados finales. Se golpearon los pocillos en una toalla absorbente limpia después de cada paso para ayudar a minimizar las burbujas.
- Los controles positivo y negativo se suministraron prediluidos. No se diluyeron más.
- Preparación de la solución de lavado: se vació el contenido de la botella con la solución de lavado concentrada en 475 ml de agua desionizada y se mezcló bien.

Prueba ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Leptospira*

interrogans

Procedimiento

1. Se rompieron el número de pocillos necesarios (dos para los controles más el número de muestras).
2. Al suero de cada paciente se le hizo una dilución de 1:40 con el búfer de dilución (10 µl del suero y 390 µl del búfer de dilución). Posteriormente se añadió 100 µl del control negativo al pocillo #1, 100 µl del control positivo al pocillo #2 y 100 µl de las muestras anteriormente diluidas al resto de los pocillos.
3. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) por 10 minutos (los anticuerpos presentes en el suero diluido se unieron con el antígeno que contiene cada pocillo).
4. Después se realizaron 3 lavados con 350 µl del buffer de lavado en una lavadora automática (Stat Fax 2600), para remover el exceso de búfer se golpeó los pocillos contra un papel absorbente. La finalidad del lavado es eliminar el exceso de suero que no reaccionó.
5. Se añadieron dos gotas del conjugado de la enzima a cada pocillo. Los anticuerpos unidos al pocillo reaccionaron con el conjugado de la enzima.

6. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) por 10 minutos, después se hicieron 3 lavados como en el paso 4 y finalmente se golpearon los pocillos contra un papel absorbente para remover el exceso de búfer.
7. Se depositaron dos gotas del cromógeno (tetrametilbenzidina o TMB) a cada pocillo. El conjugado de la enzima hizo reacción, la peroxidasa catalizó una reacción que consumió el peróxido y cambio al cromógeno de un color claro a azul.
8. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) durante 5 minutos.
9. Se añadieron dos gotas de la solución de parada a cada pocillo (está solución inactivo la reacción y cambio el color azul a uno amarillo brillante). Los pocillos fueron mezclados y golpeados suavemente por un lado de la placa durante 15 segundos aproximadamente.
10. Se llevó acabo la lectura espectrofotométrica a 540 nm en una lectora para ELISA (Stat Fax 4700), una hora después de que se añadió la solución de parada.

Prueba ELISA para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira*

interrogans.

Procedimiento

1. Se rompieron el número de pocillos necesarios, teniendo en cuenta el número de muestras y agregando dos para los controles.
2. Se realizó una dilución 1:40 (10 µl del suero y 390 µl del búfer de dilución).
3. Se tomaron 100 µl del suero diluido y se colocaron en una placa limpia, posteriormente se agregaron 40 µl del absorbente RF a cada suero diluido excepto a los controles y se mezcló bien. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (20°C). El absorbente RF ayudará a eliminar la inhibición competitiva del IgG específico.
4. Se tomó la placa que contenía los antígenos fijados y se añadieron 100 µl del control negativo al pocillo #1, 100 µl del control positivo al pocillo #2 y 100 µl y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (20 °C).
5. Se transfirieron los 140 µl de las muestras diluidas a los respectivos pocillos (los anticuerpos presentes se unirán con el antígeno que contiene cada pocillo).
6. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) durante 10 minutos.
7. Se vació el contenido de la placa y se realizaron 3 lavados con 350 µl del buffer de lavado en una lavadora automática (Stat Fax 2600).

8. Se agregaron 2 gotas del conjugado enzimático a cada pocillo. Los anticuerpos unidos al pocillo reaccionaron y se unieron con el conjugado de la enzima.
9. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) durante 10 minutos.
10. Se vació el contenido de la placa y se le dio una serie de lavados como en el paso 7 y se golpeó la placa contra un papel absorbente para remover el exceso de líquido.
11. Se agregaron 2 gotas del cromógeno (tetrametilbenzidina o TMB) a cada pocillo. El conjugado de la enzima hizo reacción, la peroxidasa catalizó una reacción que consumió el peróxido y cambió al cromógeno de un color claro a azul.
12. Se incubó a temperatura ambiente (20°C) durante 5 minutos.
13. Se agregaron 2 gotas de la solución de parada y mezclo bien (está solución inactivo la reacción y viro el color azul a uno amarillo brillante).
14. Se llevó acabo la lectura espectrofotométrica a 540 nm en una lectora para ELISA (Stat Fax 4700), una hora después de que se añadió la solución de parada.

Interpretación de controles para la detección de anticuerpos IgG e IgM

El uso de controles positivos y negativos permitió validar la estabilidad del kit, el kit no debió ser usado si los controles se encontraban fuera del rango. Los valores esperados para los controles son: control negativo 0 – 0.3 DO y el control positivo 0.5 DO o más.

Interpretación de resultados de las lecturas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Leptospira interrogans*.

Sin reacción instantánea: las muestras interpretadas como no reactivas (0-0 a 0-3 DO de absorbancia o sin color) indican que no hay anticuerpos presentes en la muestra.

Reacción débil: Si la muestra presenta lecturas de (0.3 – 1.0 DO) debe considerarse un segundo método.

Reacción instantánea: las muestras con una reacción fuerte inicial son aquellas con una absorbancia de (>1.0 DO) indica la presencia de anticuerpos específicos.

Interpretación de resultados de las lecturas de ELISA para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira interrogans*

Sin reacción instantánea: las muestras interpretadas como no reactivas (0-0 a 0-3 DO de absorbancia o sin color) indican que no hay anticuerpos presentes en la muestra.

Reacción débil: las muestras débilmente reactivas deben ser interpretadas con cautela. Si la muestra presenta lecturas de (≥ 0.5 - ≤ 1.0 DO).

Reacción instantánea: las muestras con una reacción fuerte inicial son aquellas con una absorbancia de (>1.0 DO) indica la presencia de anticuerpos específicos.

Análisis estadístico de los resultados en la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira*

La información fue integrada a una base de datos previamente diseñada, se realizaron cálculos de frecuencias absolutas y relativas. Mediante análisis bivariado a través de las pruebas no paramétricas (Chi-cuadrado) se evaluaron la existencia de asociación entre la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira* y los datos generales. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Para el procedimiento y análisis de los datos se utilizó el software SPSS 12 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron muestras de pacientes de las ciudades de Navojoa, Álamos y Huatabampo y de las comunidades El Recodo perteneciente a Navojoa, Torocobampo y Yavaros perteneciente a Huatabampo y Las Guayabas perteneciente a Etchojoa, obteniéndose un total de 137 muestras de las cuales 114 (83%) pertenecían al área rural y 23 (17%) del área urbana. La edad de los pacientes estuvo en el rango de 3 a 78 años, con un promedio de 31 ± 19 . La distribución por sexo fue la siguiente: femenino con una media de 33 ± 18 (máximo 76 y mínimo 5) y masculino 28 ± 19 (máximo 78 y mínimo 3).

La tabla 6 muestra las frecuencias porcentuales de los signos y síntomas relacionados con el síndrome febril inespecífico, como puede observarse el espectro de manifestaciones clínicas son muy variados. La cefalea estuvo presente en el 54% de los pacientes siendo el síntoma más frecuente, seguido de astenia y adinamia, observadas en el 43% y dolor de piernas en el 39%. De acuerdo a los resultados obtenidos las manifestaciones clínicas pleomórficas pudieron ser diagnosticados erróneamente como fiebre tifoidea (Higuera *et al.*, 1997; Geistfeld, 1975 y Turner, 1973), dengue, paludismo (WHO, 1982), tuberculosis (Higuera *et al.*, 1997), influenza (Turner 1973; Geistfeld, 1975 y Xolotl *et al.*, 1994), brucelosis e incluso gripe (Turner 1973 y Geistfeld, 1975). Sin embargo, estudios más recientes tanto nacionales como internacionales han demostrado que la presencia de las diversas manifestaciones clínicas se ha relacionado con la presencia de espiroquetas.

Velasco Castrejón *et al.*, 2007 estudiaron 60 pacientes con datos clínicos sugestivos de padecer leptospirosis, reportando cefalea (50%), astenia y adinamia (78%), depresión (68%), artralgias (63%), fatiga (58%) y mialgias (56%). Así mismo, Gómez *et al.*, 2009 reportaron cefalea, fiebre, mialgias y congestión conjuntival en el 100% de los pacientes. Por su parte, Kendall *et al.*, 2010 reportaron leptospirosis como una causa de fiebre en Bangladesh y Karande *et al.*, 2003 realizaron un estudio para detectar leptospirosis en Mumbai, estos investigadores reportaron los mismos síntomas: cefalea (87 y 50%), mialgias (67 y 61.1%), disnea (8%), anorexia (73%) respectivamente. En estudios recientes relacionados con fiebre de origen desconocido con manifestaciones clínicas sospechosas a leptospirosis, la presencia de cefalea (75, 66.3 y 75%), fiebres (100, 86,5 y 100%) y artralgias (45, 40.4 y 45%) fueron síntomas en común reportados por Bal AM *et al.*, 2005; Laguado *et al.* 2005 y Jauréguiberry *et al.*, 2005 respectivamente. Vado Solis *et al.*, 2002 realizaron una investigación clínico epidemiológico en leptospirosis humana en Yucatán México reportando una frecuencia de signos y síntomas que incluyeron cefalea (90,4%), mialgias (84,6%) y fiebre (100%) en los casos anictéricos, mientras que en los casos ictéricos fueron fiebre, cefalea, coluria e ictericia (100%) en 61 casos sospechosos a *Leptospira* en el periodo 1998-2000.

Otros datos sugieren la presencia de síntomas inusuales relacionados con el síndrome febril inespecífico causado por espiroquetas del género *Leptospira*, estas manifestaciones son dolor de ojos que puede cursar con alteraciones visuales; fatiga crónica con recaídas frecuentes que pueden incapacitar al paciente; también puede presentarse durante algunos años depresión de diferente intensidad, acompañada de irritabilidad; otros cambios psicológicos son los cambios de humor y alteraciones en

las relaciones interpersonales (Kobayashi, 2005). La existencia de algunas o todas las manifestaciones anteriormente mencionadas sugieren que el síndrome febril inespecífico pueden manifestarse como leves, severas o fatales (Carrada Figueroa *et al.*, 2002).

Es importante señalar que debido al alto grado de polimorfismos clínico de las enfermedades relacionadas con el síndrome febril de origen desconocido producidas por espiroquetas del género *Leptospira* y *Borrelia* pueden con facilidad confundirse con otras entidades nosológicas como el dengue clásico, la influenza, neumonías, histoplasmosis, fiebre entérica, fiebre amarilla, hepatitis viral entre otras. Por tal razón la incidencia que se reporta de ella, sobre todo en las zonas donde no existe o es muy reducida la posibilidad de confirmación etiológica, no demuestra en su totalidad el valor real de morbilidad existente (Zavala-Velázquez *et al.*, 1998; Wesley Farr, 1994; Sasaki *et al.*, 1993; Yersin *et al.*, 2000; Vado Solis *et al.*, 2002; Cespedes *et al.*, 2008).

Tabla 6. Signos y Síntomas relacionados con el síndrome febril inespecífico.

Signos y Síntomas	Frecuencia	%
Cefalea	74	54
Astenia	59	43
Adinamia	59	43
Dolor de piernas	53	39
Dolor de espalda	52	38
Fiebre	51	37
Escalofríos	51	37
Somnolencia diurna	47	34
Congestión conjuntival	44	32
Mialgia	44	32
Artralgia	38	28
Insomnio	35	26
Perdida de la memoria	32	23
Palpitaciones	31	23
Febrícula	32	23
Cambio de carácter	30	22
Fatiga	30	22
Diaforesis	24	18
Sudoraciones nocturnas	25	18
Vértigo	25	18
Acufenos	22	16
Meteorismo	20	15
Depresión	19	14
Dolor ocular	19	14
Ansiedad	15	11
Disminución aguda visual	15	11
Dolor abdominal	15	11
Disestesias	14	10
Neuritis	14	10
Fotofobia	13	9
Anorexia	10	7
Distensión abdominal	10	7
Confusión mental	9	7
Petequia	8	6
Edemas	7	5
Exantema	7	5
Equimosis	6	4
Cuadro psicótico	5	4
Hiperestesia cutánea	5	4
Disuria	4	3
Sangrado	3	2
Disnea de esfuerzo	3	2
Acolia	1	1

Detección de espiroquetas por microscopia de campo oscuro

La tabla 7 muestra los resultados del examen directo mediante microscopia de campo oscuro donde se presentó una positividad a espiroquetas compatibles a *Leptospira* en 130 pacientes (95%) y una negatividad en 7 pacientes (5%). De los 137 pacientes 81 (59%) fueron mujeres de las cuales 78 (96%) dieron resultados positivos a espiroquetas mediante microscopia de campo oscuro. Los pacientes masculinos fueron 56 (41%) con una positividad a espiroqueta en 52 pacientes (92%). En la misma tabla, se puede observar que la comunidad El Recodo presentó el mayor número de casos positivos en ambos sexos. Flores Baca 2008 obtuvo resultados similares al analizar sangre periférica en pacientes procedentes del Hospital General de Navojoa, reportando una positividad a espiroquetas del 79% y una negatividad del 21%. De los casos positivos, el 59% fueron pacientes femeninas y el 20% masculinos. Por otro lado, Velasco Castrejón *et al.*, 2007 reportaron la presencia de espiroquetas por microscopia de campo oscuro en el 82% de los casos, los cuales, fueron confirmados mediante cultivo microbiológico. Los autores sugieren que la microscopia por campo oscuro puede ser considerada como una técnica diagnóstica rápida, sensible y eficaz.

Tabla 7. Resultados de la observación por microscopia de campo oscuro.

Localidad	Total (n=137)	Número de casos por sexo			
		Femenino		Masculino	
		Positivos* (n=78)	Negativos (n=3)	Positivos* (n=52)	Negativos (n=4)
Navojoa	16	12	-	4	-
Álamos	5	1	-	4	-
Huatabampo	2	2	-	0	-
Yavaros	13	8	1	3	1
Las Guayabas	8	1	-	7	-
El Recodo	69	43	2	21	3
Torocobampo	24	11	-	13	-

*Se observó en 20 campos la presencia de espiroquetas compatibles a *Leptospira*

Detección de anticuerpos IgG contra *Leptospira*

La detección de anticuerpos contra *Leptospira* se llevó de acuerdo al protocolo del método ELISA comercial (DIAGMEX), las lecturas obtenidas fueron expresadas como DO (densidad óptica). Los valores control de DO obtenidos en el presente trabajos fueron 0.006 (control negativo) y 1.574 (control positivo) los cuales se hallaron dentro de los parámetros establecidos por el proveedor.

La tabla 8 muestra los resultados de DO de los 137 pacientes analizados, se puede observar que 78 casos fueron negativos con un rango de 0.004 a 0.298 DO. Así mismo, se presentaron 59 casos positivos con un rango de 0.328 a 3.25 DO y un promedio de 0.914 ± 0.540 . De los casos francamente positivos (1.027 a 3.25 DO) se presentaron una reacción intensamente coloreada por la presencia del cromógeno TMB (figura 15). Los resultados positivos mostraron que los diferentes valores de absorbancia se correlacionan con la presencia de los anticuerpos IgG del paciente y el antígeno fijo en la placa de ELISA (Hartleben *et. al.*, 2013). Estos resultados indicaron que el 43% (59/137) presentaron serología positiva para anticuerpos IgG contra *Leptospira*. La positividad en el sexo femenino fue 43.2% (35/81) y el masculino 42.8% (24/56), no se encontraron diferencias significativas (OR=0.89; IC 95%: 0.51 – 2.01), es decir, el sexo no es un factor determinante para adquirir la infección.

La importancia de la detección de anticuerpos del tipo IgG radica en el papel que estos realizan a nivel inmunológico, estudios realizados por Rodríguez *et al.*, 2001 demostraron que el papel fundamental de los anticuerpos IgG es brindar protección contra la enfermedad debido a su alta capacidad opsonizante.

La seropositividad según la procedencia se distribuyó de la siguiente manera: El Recodo (12%), Torocobampo (10%), Las Guayabas y Yavaros (5%), Álamos (3%) y Huatabampo (1%). En la tabla 9 se describen las características por localidad y sexo.

Tabla 8. Resultados espectrofotométricos para la detección anticuerpos IgG.

0.006	0.008	0.036	0.116	0.177	0.328	0.595	0.83	1.294
LS74**	0.008	0.036	0.117	0.192	0.357	0.604	0.864	1.317
0.004	0.008	0.04	0.12	0.198	0.361	0.607	0.876	1.336
0.004	0.008	0.044	0.123	0.199	0.362	0.608	0.9	1.344
0.004	0.008	0.044	0.126	0.202	0.371	0.612	0.906	1.47
0.004	0.008	0.048	0.128	0.202	0.393	0.626	0.943	1.499
0.005	0.009	0.053	0.132	0.205	0.403	0.651	1.027	1.693
0.005	0.01	0.056	0.133	0.208	0.421	0.716	1.062	1.747
0.005	0.01	0.072	0.133	0.234	0.425	0.717	1.114	1.958
0.006	0.012	0.077	0.135	0.249	0.438	0.721	1.118	2.375
0.006	0.021	0.085	0.138	0.25	0.442	0.733	1.129	3.325
0.007	0.026	0.085	0.145	0.264	0.448	0.759	1.142	
0.007	0.03	0.087	0.149	0.266	0.499	0.77	1.157	
0.007	0.032	0.095	0.161	0.266	0.506	0.771	1.157	
0.007	0.032	0.098	0.169	0.283	0.524	0.794	1.213	
0.008	0.033	0.112	0.169	0.298	0.553	0.812	1.232	

*Control negativo, **Control positivo, Lecturas DO en color negro (valor negativo), Lecturas DO en color verde (valor positivo)

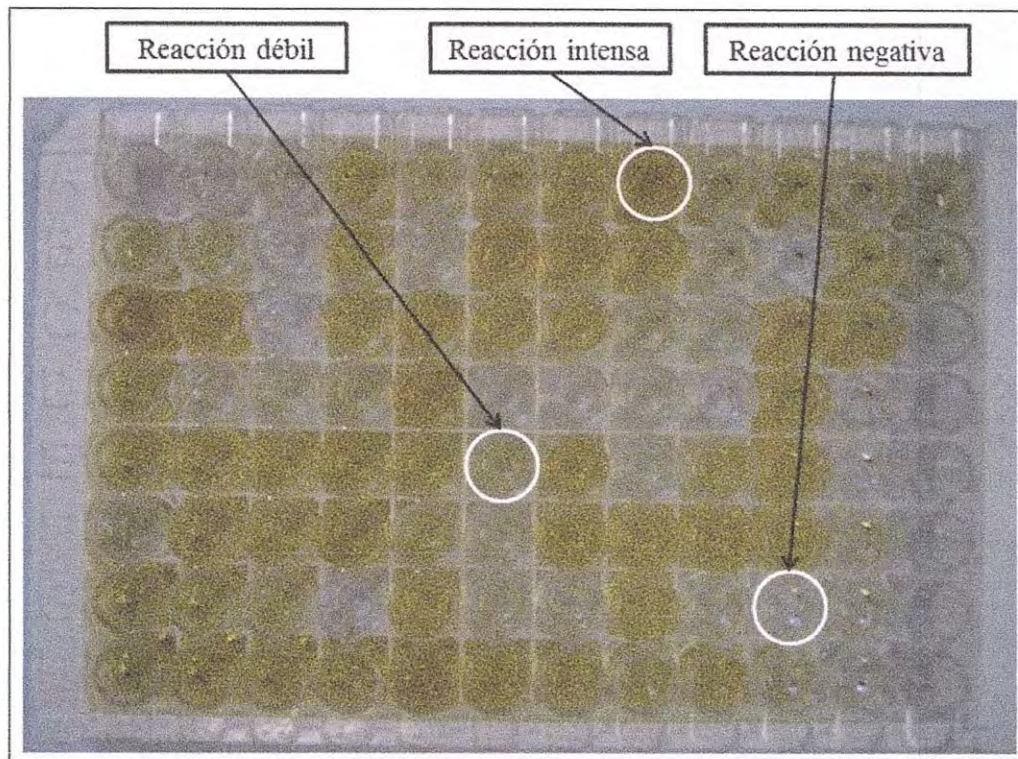


Figura 15. Intensidad de coloración de la reacción en los pozos para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira*.

Tabla 9. Resultados de la detección de anticuerpos IgG contra *Leptospira* de acuerdo al lugar de procedencia.

Localidad	anticuerpos anti- <i>Leptospira</i>				anticuerpos anti- <i>Leptospira</i>			
	Total		Resultados positivos		Total		Resultados negativos	
	Casos (n=59)	%	Masculino (n=24)	Femenino (n=35)	Casos (n=78)	%	Masculino (n=32)	Femenino (n=46)
Navojoa	9	7	1	8	7	5	3	4
Las Guayabas	7	5	4	3	6	4	3	3
El Recodo	17	12	7	10	49	36	17	32
Álamos	4	3	3	1	1	1	1	0
Yavaros	7	5	2	5	5	4	2	3
Torocobampo	14	10	7	7	9	6	6	3
Huatabampo	1	1	0	1	1	1	0	1

Deteción de anticuerpos IgM contra *Leptospira*

Los valores de DO obtenidos en el presente trabajos fueron 0.041 y 2.466 para el control negativo y positivo respectivamente, los cuales se encuentran dentro los parámetros establecidos por el proveedor.

La tabla 10 muestra los resultados de DO de los pacientes incluidos en el estudio. Se observó que el 73.7% (101/137) fueron negativos con un rango de 0.005 a 0.479 de DO. La serología positiva fue de 26.3% (36/137) con un rango de 0.523 a 1.924 DO y un promedio de 0.960 ± 0.438 . Los resultados francamente positivos se presentaron en un rango de 1.047 a 1.924 DO, con intensidad de respuesta igual a la presentada por anticuerpos IgG (figura 15). El punto de corte positivo sugerido por el proveedor (DIAGMEX) fue 0.50 DO, este es similar al reportado por Tanganuchicharnchai *et al.*, 2012 quienes reportaron la utilización de un ELISA comercial (Standard Diagnostics, Yongin-si, South Korea) con un punto de corte 0.75 DO, ambos productos sugieren una sensibilidad de 100% y (90 a 96%) respectivamente. La sensibilidad y especificidad del ELISA comercial se ajusta mediante el punto de corte (Tanganuchicharnchai *et al.*, 2012).

Las lecturas de DO positivas obtenidas en el presente estudio (0.523 – 1.924 DO) y una media 0.960 ± 0.438 son similares a las reportadas por Cespedes *et al.*, 2002, quienes reportaron un rango entre 0.88 a 2.08 con un valor de la media de 1.63 ± 0.54 , en pacientes con sospecha clínica y epidemiológica a leptospirosis en un estudio realizado en Perú.

Tabla 10. Resultados espectrofotométricas en la detección anticuerpos IgM.

0.041*	0.009	0.012	0.016	0.115	0.283	0.448	0.609	1.047
2.466**	0.009	0.012	0.016	0.127	0.286	0.449	0.614	1.133
0.005	0.01	0.012	0.016	0.138	0.29	0.46	0.633	1.289
0.006	0.01	0.013	0.016	0.146	0.294	0.463	0.681	1.35
0.007	0.01	0.013	0.016	0.149	0.304	0.478	0.721	1.497
0.008	0.01	0.014	0.018	0.162	0.324	0.479	0.73	1.608
0.008	0.01	0.014	0.019	0.187	0.333	0.479	0.761	1.69
0.008	0.01	0.014	0.019	0.19	0.347	0.523	0.767	1.701
0.008	0.01	0.014	0.028	0.206	0.349	0.533	0.813	1.787
0.008	0.01	0.014	0.031	0.22	0.361	0.54	0.823	1.891
0.009	0.011	0.015	0.049	0.229	0.367	0.543	0.831	1.924
0.009	0.011	0.015	0.056	0.252	0.395	0.554	0.856	
0.009	0.012	0.015	0.066	0.259	0.399	0.559	0.921	
0.009	0.012	0.015	0.084	0.26	0.408	0.577	0.94	
0.009	0.012	0.016	0.104	0.267	0.429	0.578	0.97	
0.009	0.012	0.016	0.115	0.269	0.446	0.588	0.992	

*Control negativo, **Control positivo, Lecturas DO en color negro (valor negativo), Lecturas DO en color verde (valor positivo)

La incidencia en la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* IgM mediante ELISA indirecto se puede observar en la Tabla 11. Estos resultados indicaron que el 26.2% (36/137) presentaron serología positiva para anticuerpos IgM contra *Leptospira*. La positividad en el sexo femenino fue 27.2% (22/81) y el masculino 25% (14/56), no se encontraron diferencias significativas (OR=1.17; IC 95%; 0.51 – 2.43). Los resultados de este estudio muestran una alta prevalencia de la fase activa de la enfermedad, lo cual, evidencia el reciente contacto con *Leptospira*.

Diversos investigadores han reportado una prevalencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira* del 13.3% y 13.1% en población con alto riesgo de exposición a la infección realizado en Perú (Ríos *et. al.*, 2008; Najera *et. al.*, 2005). Así mismo, Vado-Solis *et. al.*, 2002 reportó una prevalencia del 13.9% en un estudio realizado en Yucatán México, quienes demostraron que la transmisión directa e indirecta del agente etiológico de los animales al hombre se ha mantenido constante y activo.

La tabla 11 muestra los resultados de la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira* por localidad y sexo. De acuerdo al lugar de procedencia las comunidades presentaron una prevalencia de anticuerpos IgM de la siguiente forma: El Recodo y Torocobampo (7%), seguido de Navojoa (5%), Yavaros (3%), Álamos (2%) y Las Guayabas y Huatabampo (1%). La prevalencia de anticuerpos IgM en las distintas poblaciones puede deberse a las condiciones climáticas de la región, socioeconómicas, por el contacto con animales y las diferentes labores que desempeñan sus habitantes (Ríos *et. al.*, 2008; Vado-Solis *et. al.*, 2002).

Tabla 11. Resultados de la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira* de acuerdo al lugar de procedencia.

Localidad	anticuerpos anti- <i>Leptospira</i>				anticuerpos anti- <i>Leptospira</i>			
	Total		Resultados positivos		Total		Resultados negativos	
	Casos (n=36)	%	Masculino (n=14)	Femenino (n=22)	Casos (n=101)	%	Masculino (n=42)	Femenino (n=59)
Navojoa	7	5	1	6	9	7	3	6
Las Guayabas	2	1	1	1	11	8	6	5
El Recodo	9	7	2	7	57	42	22	35
Álamos	3	2	3	0	2	1	1	1
Yavaros	4	3	2	2	8	6	2	6
Torocobampo	10	7	5	5	13	9	8	5
Huatabampo	1	1	0	1	1	1	0	1

Reacciones cruzadas en la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Leptospira*

En el estudio se encontraron pacientes que presentaron positividad simultánea tanto para anticuerpos IgM e IgG contra *Leptospira*, la cual se muestra en la tabla 12.

En este estudio se presentaron 16.8% (16/95) de casos cruzados, lo cuales correspondieron al sexo femenino 13.5% (11/81) y masculinos 8.9% (5/56). Las localidades que presentaron una prevalencia de casos cruzados IgG e IgM fueron: Navojoa y Torocobampo (25%), El Recodo (18.7%), Álamos (12.5%) y por último Huatabampo, Las Guayabas y Yavaros (6.2%).

Se puede observar que las muestras 27, 32 y 73 mostraron una DO con tendencias a IgM, estos resultados pueden sugerir una reinfección con respuesta inmediata reincidencia de la bacteria (Ryan y Ray, 2011). Las tendencias que presentaron las muestras (11, 30, 42, 13, 40, 50 y 58) a una positividad para IgG, sugiere que la producción de anticuerpos después de la primera infección por *Leptospira* fue variable, pero en general, los anticuerpos IgG séricos pudieron ser detectados al final de la primera semana posterior a la aparición de la enfermedad y alcanzaron DO altas (Levett, 2001). A partir de entonces, los pacientes suelen permanecer seropositivos a IgG de longitud variable de tiempo, dependiendo del estado inmunitario (Cumberland *et. al.*, 2001; Everard y Bennett, 1990; Lupidi *et. al.*, 1991; Plank y Dean, 2000; Romero *et. al.*, 2003; Silva *et. al.*, 1995). Las muestras presentaron DO muy similares (7, 43, 48, 54, 77 y 8) para IgG e IgM, puede ser atribuido a la tendencia a la respuesta inmunológica de IgM conmuta a IgG (Ryan y Ray, 2011).

Tabla 12. Reacciones Cruzadas para los anticuerpos IgM e IgG.

Nº de Muestra	Procedencia	Sexo	DO para IgM	DO para IgG
7	Navojoa	Femenino	0.730	0.759
30	Navojoa	Femenino	1.047	1.747
42	Navojoa	Femenino	0.577	1.693
43	Navojoa	Femenino	0.578	0.651
11	Álamos	Masculino	1.133	1.499
13	Huatabampo	Femenino	0.559	1.027
27	Yavaros	Masculino	1.891	0.733
32	Las Guayabas	Femenino	1.924	0.716
40	Álamos	Masculino	1.497	2.375
48	Torocobampo	Masculino	0.823	0.906
50	Torocobampo	Femenino	0.831	1.294
54	Torocobampo	Femenino	1.289	1.344
58	Torocobampo	Femenino	0.614	1.157
73	Recodo	Femenino	1.350	0.448
77	Recodo	Femenino	1.701	1.213
78	Recodo	Masculino	0.992	0.794

Esta prevalencia del 69% es muy similar a la reportada por Swapna *et al.*, 2006, quienes reportaron una seroprevalencia bajo las mismas condiciones con un 76% en un estudio realizado en la India. Así mismo, se observaron 16 casos cruzados los cuales pueden ser atribuidos a la exposición repetida a las *Leptospiras* pudiendo estimular la respuesta inmunitaria sin causar infección sintomática leve y esto puede explicar por qué la población en zonas con condiciones favorables para la transmisión de la leptospirosis, o sujetos con un alto riesgo ocupacional para contraer leptospirosis, pueden mantener valores de DO francamente positivos interpretados como anticuerpos (IgG/IgM) sin que sufra de la enfermedad aguda (Johnson *et al.*, 2004).

Diversos investigadores han empleado el método ELISA IgG e IgM para la detección de leptospirosis y demostraron que cuando emplearon solamente ELISA IgM vs. MAT, esta última tenía mayor sensibilidad y especificidad; en contraste cuando compararon ELISA IgG y ELISA IgM vs. MAT, ELISA tenía mayor sensibilidad y especificidad (Rodríguez *et al.*, 2001; Cespedes *et al.*, 2002; Swapna *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El sur del estado de Sonora, así como en algunos estados de México, la leptospirosis es una zoonosis raramente diagnosticada, probablemente por su alto grado de polimorfismo clínico o por la ausencia de métodos diagnósticos que dificultan en mayor grado la confirmación de la relación del síndrome febril inespecífico y la presencia de *Leptospira*.

El estudio mostró que los signos y síntomas sugerían la presencia de espiroquetas compatibles con *Leptospira*, manifestándose principalmente como cefalea, astenia, adinamia, dolor de piernas, dolor de espalda y fiebre, siendo estos síntomas clásicos de un síndrome febril inespecífico.

Así mismo, los análisis de laboratorio permitieron detectar la presencia de espiroquetas compatibles a *Leptospira* mediante microscopia de campo oscuro demostrando ser un método práctico, rápido y de bajo costo para el diagnóstico presuntivo de enfermedades relacionadas con las espiroquetas.

Consiguientemente, el método ELISA empleado en este trabajo manifestó la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-*Leptospira* en los diferentes estadios de la enfermedad. Por tal motivo, el método ELISA puede ser empleado como prueba de seguimiento de rutina en el diagnóstico de leptospirosis en el laboratorio.

Ante la evidencia de información clínica, microscópica y serológica encontrada, se concluye que los signos y síntomas presentados en pacientes provenientes del sur del estado de Sonora México cuyo diagnóstico fue el síndrome febril inespecífico se encontró relacionado con la presencia de *Leptospira*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas Abul K., Lichtman Andrew H. H., Pillai Shiv. Inmunología básica y clínica. 6a Edición; El Manual Moderno. 2008
- Acosta H., Moreno C. y Viáfara D. Leptospirosis. Revisión de tema, Colombia Médica 1994; 25: 36-42.
- Arce-Salinas César Alejandro, Morales-Velázquez José Luis, Villaseñor-Ovies Pablo, Muro-Cruz Daniel. Classical fever of unknown origin (FUO): current causes in Mexico. Revista de Investigación Clínica / Vol. 57, Núm. 6 / Noviembre-Diciembre, 2005 / pp 762-769.
- Bal Am. Unusual Clinical Manifestations of Leptospirosis. J Postgrad Med 2005; 51:179-83
- Baquero P. M., Gómez A. y Hernández R. P. (2010). Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp. Revista de Medicina Veterinaria N° 19.
- Brook, G.F., Butel, J.S. y Morse, S. A. (2008). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Espiroquetas y otros microorganismos espirales. 19a Edición, México: El Manual Moderno.
- Caro Lozano Janett, Zúñiga Carrasco Iván Renato, Villanueva Domínguez Joel. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la leptospira en México. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría Vol. XXIII Núm. 92. Abril-Junio 2010.
- Carrada-Figueroa, Georgina. Calderón-Valencia, Elsa G. Martínez-Hernández Clara M. Leptospirosis: Pleomorfismo Clínico en el Síndrome Febril. Salud en Tabasco, Vol. 8, Núm. 3, Diciembre, 2002, pp. 128-132.
- Centers for Disease Control and prevention (CDC) 2005. <http://www.cdc.gov/>
- Céspedes Z., Manuel Glenny A., Martha; Felices A., Vidal; Balda J., Lourdes; Suárez M., Víctor. (2002). Prueba de Elisa indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.
- Céspedes Zambrano Manuel y Glenny Araujo Martha (2002). Instituto nacional de salud. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Págs. 40, 41.
- Céspedes Manuel, Balda Lourdes y Glenny Martha. Evaluación de dos Ensayos de ELISA IgM en la Investigación de un Brote de Leptospirosis. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública, Jul. /Set. 2008, Vol.25, No.3, P.333-335.
- Chungara Montaña Jorge, Banda Jara Beatriz, Moreno Lago Omar. Sífilis congénita presentación de un caso clínico radiológico. Revista cuadernos. Vol. 51-2/2006 pp 66-69.

- Cumberland, P., Everard, C.O., Wheeler, J.G., Levett, P.N., 2001. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 601–608.
- Dammert Nicole. (2005). Leptospirosis: una revisión bibliográfica. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Everard, C.O., Bennett, S., 1990. Persistence of leptospiral agglutinins in Trinidadian survey subjects. *Eur. J. Epidemiol.* 6, 40–44.
- Fajardo Esther María, Ortiz Bernardo, Chávez Adelina, Gaínza Noemí, Izquierdo Luis, Hernández Yaumara, Labrador Iyalili Y Álvarez Eduardo. Normalización de la Dosis Letal 50 % de Cepas de *Leptospira Interrogans* Utilizadas en el Control de la Vacuna Antileptospirósica Cubana para uso Humano. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(1):22-6.
- Fauci, Anthony S.-Braunwald, Eugene-Kasper, Dennis L-. Hauser, Stephen L.(2008). *Harrison principios de medicina interna*. 17a edición. México; McGraw-Hill.
- Flores Baca H. (2008). Importancia de la microscopia de campo oscuro para el diagnóstico de leptospirosis humana en pacientes con síndrome febril en estudio del Hospital General de Navojoa Sonora, en el periodo de septiembre-noviembre del 2007. Tesis para obtener el título de Químico Biólogo Clínico. Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, Navojoa Sonora.
- Gamarra Roberto. Leptospirosis, revisión bibliográfica (2009). Facultad de Medicina Veterinaria Investigación II Maestría en Salud Animal.
- Geistfeld J. Leptospirosis in the United States. *J. Infect, Dis*; 1975; 131(6): 743.
- Ginebra Gonzalez Olga (2001). *Microbiología y parasitología médica*. Tomo I. Capítulo 37: microorganismos espirales.
- Gómez Rivera Norberto, Álvarez Hernández Gerardo, García Zárate María Guadalupe, Fonseca Chon Ignacio, Cano Rangel Manuel Alberto, Villalobos García Luis, Vázquez Pizaña Elba, Pérez Moya Giuseppe Doménico. Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en niños. Informe de 18 casos. *Revista mexicana de pediatría*. Vol. 76, Núm. 6 • Noviembre-Diciembre 2009. pp 245-250.
- Hartleben CP, Leal FM, Monte LG, Hartwig DD, Seixas FK, Vasconcellos SA, Brihuega B, Dellagostin OA. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. February 2013, Volume 66, Issue 2, pp 106-109.
- Higuera A., Flores F., Ortiz G. y Montesano R. Seroprevalencia de leptospirosis en Balancán, Tabasco. Abril 1997. *Mem. XXII Cong. Inter. Asoc. Méx. Infect. Microbiol. Clin*; 1997; 17 (5); 79.
- Jauréguiberry S, Roussel M, Brinchault-Rabin G, Gacouin A, Le Meur A, Arvieux C, Michelet C, Tattevin P. Clinical Presentation of Leptospirosis: A

Retrospective Study of 34 Patients Admitted to a Single Institution in Metropolitan France. *Clin Microbiol Infect.* 2005 May; 11(5):391-4.

- Jiménez Aristizabal Lina M. (2006) Revisión actualizada sobre métodos de identificación y diagnóstico de Leptospirosis en bovinos.
- Johnson Michael A.S., Smith Hannah, Joseph Priya., Gilman Robert H, Bautista Christian T., Campos Kalina J., Cespedes Michelle, Klatsky Peter, Vidal Carlos, Hilja , Calderon Maritza M., Coral Carlos, Cabrera Lilia, Parmar Paminder S., and Vinetz Terry Joseph M. Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru. Volume 10, Number 6—June 2004.
- Karande S, Bhatt M, Kelkar A, Kulkarni M, De A, Varaiya A. An Observational Study to Detect Leptospirosis in Mumbai, India, 2000. *Arch Dis Child.* 2003 Dec; 88(12):1070-5.
- Kendall, Emily A. LaRocque, Regina C. Bui, Duy M. Galloway, Renee. Ari, Mary D. Goswami, Doli. Breiman, Robert F. Luby, Stephen and Brooks W. Abdullah. Leptospirosis as a Cause of Fever in Urban Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(6), 2010.
- Kindt Thomas J., Goldsby Richard A., Osborne Barbara A. *Inmunología de Kuby*. 6ª Edición. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2007.
- Kobayashi Y. Human leptospirosis: Management and prognosis. *J Postgrad Med* 2005;51:201-4.
- Koivunen Marja E. y Krogsrud Richard L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *LABMEDICINE*. Volume 37 Number 8. August 2006.
- Laguado, J., Alvis, N., Máttar, S. Investigación de un Brote de Fiebre de Origen Desconocido en una Localidad Colombiana del Caribe. *Colombia Médica*, Octubre-Diciembre 2005. Vol. 36, No. 0004.
- Lemarroy Darío y Carrillo Mauro (2003). Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple. Caso clínico y revisión de la literatura. *Revista de la asociación mexicana de medicina crítica y terapia intensiva* Vol. XVII, Núm. 5.
- Levett Paul (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 14 No. 2.
- Lupidi, R., Cinco, M., Balanzin, D., Delprete, E., Varaldo, P.E., 1991. Serological followup of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 805–809.
- Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack, Sánchez Pérez Miguel. *Biología de los microorganismos: Brock*. 10ª Edición. Pearson, Príncipe Hall, 2003.
- Martínez M. Alejandro (1988). “El microscopio de campo oscuro”. *Revista de difusión*.
- Mathews Christopher K., Ahern Kevin G., Van Holde Kai Eduards. *Bioquímica*. 2a Edición. Addison-Wesley Iberoamericana España, S.A., 1998.

- McBride, Alan JA; Athanazio, Daniel A; Reis, Mitermayer G; Ko, Albert I. *Leptospirosis: Current Opinion in Infectious Diseases*, October 2005 - Volume 18 - Issue 5 - p 376-386.
- McDonough, L. 2001. *Leptospirosis en Caninos - Estado Actual*. Department Of Population Medicine and Diagnostic Science, Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. A0112.0701.
- McKenzie Shirlyn B. *Hematología Clínica*. 2ª Edición. El Manual Moderno, 2009.
- Meheus A., (1996). *Treponemal Infections In: Non-venereal Treponematoses*. The Medicine Group (Journals) Ltd. Pág.69-75.
- Mullis K., Fallona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LI (1986) Cold Spring Harbor Laboratory 0-87969-052-2/86
- Murray Patrick R., Rosenthal Ken S., Pfaller Michael A. *Microbiología médica*. 5ª Edición. Elsevier España, 2006.
- Nájera S, Alvis N, Babilonia D, Álvarez L, Mattar S. *Leptospirosis ocupacional en una región del caribe colombiano*. *Salud Pública Mex*. 2005; 47:240-4.
- Plank, R., Dean, D., 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*. 2, 1265–1276.
- Pumarola A., Torres Rodriguez A., Garcia Rodriguez J.A. y Piedrola Angulo G. (1987). *Microbiología y parasitología Médica* 2a Edición, Elsevier, España.
- Ríos Rodrigo, Franco Sila, Mattar Salim, Urrea Mary, Tique Vaneza. *Seroprevalencia de Leptospira sp., Rickettsia sp. Ehrlichia sp. en trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia*. *Infect*. 2008, vol.12, n.2.
- Roca B. (2006). *Leptospirosis*. *REV MED UNIV NAVARRA/VOL 50, N° 2, 3-6*
- Rodríguez, YoandraGonzález, Marta; Ferriol, Xenia; Medina, Roger; Ochoa, Rolando; Baró, Morelia; Armesto, Marlene; Talavera, Arturo; Sierra, Gustavo. (2001). *Respuesta IgG inducida en población de riesgo vacunada con vax-SPIRAL (Vacuna Antileptospirósica Trivalente: canicola, copenhageni y mozdok)*. *Vaccimonitor*.
- Romero, E.C., Bernardo, C.C., Yasuda, P.H., 2003. *Humanleptospirosis: a twenty-nineyear serological study in Sao Paulo, Brazil*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45, 245–248.
- Ryan Kenneth J., Ray C. George. *Microbiología médica de Sherris*. 5a edición. 2011. McGraw Hill.
- Sandoval Petris Edgar (2010). *Bioproceso para la obtención de un vector de ADN plasmídico de uso potencial como vacuna contra leptospirosis en Sonora*. Tesis para obtener el título de maestro en biociencias en la Universidad de Sonora.

- Sasaki DM, Pang L, Minette HP, Wakida CK, Fujimoto WJ, Manea SJ, et al. Active surveillance and risk factor for leptospirosis in Hawaii. *Am J Trop Hyg* 1993; 48:35- 43.
- Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. México, 2001. <http://www.salud.gob.mx/>
- Silva, M. V., Camargo, E. D., Batista, L., Vaz, A. J., Brandao, A. P., Nakamura, P. M., Negrao, J. M., 1995. Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J. Trop. Med. Hyg.* 98, 268–272.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), 2012. www.sinave.gob.mx/
- Solano Antonio, Boza Ricardo y Saenz Elizabeth. (1996). Leptospirosis en humanos. *Rev. Cost de Ciencias Médicas.* Vol 17 / No 2.
- Swapna R N, Tuteja U, Nair L, Sudarsana J. Seroprevalence of leptospirosis in high risk groups in Calicut, North Kerala, India. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:349-52.
- Tanganuchitcharnchai A, Smythe L, Dohnt M, Hartskeerl R, Vongsouvath M, Davong V, Lattana O, Newton Pn, Blacksell Sd. Evaluation of the Standard Diagnostics Leptospira IgM ELISA for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Lao Pdr. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Sep; 106(9):563-6.
- Terr Abba I, Parslow Tristram G., *Inmunología básica y clínica.* 9ª Edición. El Manual Moderno, 1998.
- Tortora, Gerard J. Funke, Berdell R. and Case Christine L. *microbiology: an introduction.* Benjamin Cummings; 8 edition, 2003.
- Turner L. Leptospirosis. *Brith Med. J;* 1973; 1: 537.
- Vado Ignacio; Cárdenas, María; Laviada Hugo, Vargas Francisco, Jiménez Bertha, Zavala Jorge. (2002). Estudio de casos clínicos e incidencia de Leptospirosis humana en el Estado de Yucatán, México durante el período 1998 a 2000. *Rev Biomed;* 13:157-164.
- Velasco Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Sánchez-Spíndola Me, Soriano J, Rivera-Reyes Hh, Garibay Sv. Leptospirosis Crónica en México: Diagnóstico Microscópico y Evidencias que Respaldan su Existencia e Importancia. *Rev Latinoamer Patol Clin* 2009; 56.
- Velasco-Castrejón, Oscar; Rivas Sanchez, Beatriz; Espinoza Hernández, Jacqueline y Martínez Hernández, Enrique. Diagnóstico de leptospirosis crónica, comparación entre la aglutinación microscópica y 3 técnicas diagnósticas confirmatorias. *Rev Cubana Med Trop.* 2007, vol.59, n.1.
- Wesley-Farr R. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1994; 21:1-8.
- WHO. Organización Mundial de la Salud. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Traducción del Centro Panamericano de

- Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – VP/OPS/OMS, 2008.
- WHO. World Health Organization. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneve, Switzerland; 1982; Publication N° 67.
- Williams John G.K., Kubelik Anne R., Livak Kenneth J., Rafalski J. Antoni, Tingey Scott V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* (1990) 18, 6531.
- Wormser Gary P., Dattwyler Raymond J., Shapiro Eugene D., Halperin John J., Steere Allen C., Klemperer Mark S., Krause Peter J., Bakken Johan S., Strle Franc, Stanek Gerold, Bockenstedt Linda, Fish Durland, J. Dumler Stephen, and Nadelman Robert B. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Guidelines. CID* 2006:43 (1 November).
- Xolotl M., Ariza R., Frati A y Caballero A. Leptospirosis. Informe de 61 casos. *Rev.Med. IMSS; (Méx).* 1994; 32: 417-420.
- Yersin C, Bovet P, Merien F, Clément J, Laille M, Perolat P. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:71-6.
- Zambrano Villa Sergio A. *Inmunología: básica y clínica. 1ª Edición.* McGraw-Hill, 2007.
- Zavala-Velázquez J, Vado-Solís I, Rodríguez-Félix M, Rodríguez-Angulo E, Barrera-Pérez A, Guzmán-Marín E. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. *Rev Biomed* 1998; 9:78-83.

ANEXOS

Glosario de signos y síntomas

Acolia: heces de color blanco, debido a la falta de secreción biliar.

Acufenos: sensación auditiva que no corresponde a ningún sonido real del exterior.

Adinamia: agotamiento neuromuscular, el cual dificulta la realización de actividad física. Este cansancio caracteriza a ciertas enfermedades, en especial a ciertas formas de pirexias.

Anorexia: pérdida o disminución del apetito.

Ansiedad: estado de alerta aumentado debido al sentimiento de peligro inminente o indeterminado, que se acompaña de un estado de malestar, de agitación, de desconcierto y anonadamiento ante este peligro.

Artralgia: dolor articular sin que exista lesión aparente en la articulación.

Astenia: falta o disminución notoria de las fuerzas.

Cefalea: molestia y/o dolor craneal violento y duradero.

Confusión mental: estar a punto de ir a algún lugar o hacer algo y olvidarlo en el camino.

Congestión conjuntival: Ojo rojo e inflamado.

Cuadro psicótico: pérdida del contacto de la realidad

Depresión: síndrome caracterizado por una tristeza profunda, disminuyendo así el estado de ánimo.

Diaforesis: Sudoraciones y/o transpiraciones abundantes.

Disestesias: trastorno en la sensibilidad superficial táctil.

Disminución aguda visual: dificultar para enfocar objetos.

Disnea de esfuerzo: falta de aire al esfuerzo.

Distensión abdominal: afección en la que el abdomen (vientre) se siente lleno y apretado. El abdomen puede lucir hinchado (distendido).

Disuria: dificultar al orinar

Dolor ocular: sensación dolorosa ubicada en o alrededor del ojo. También se puede sentir como si tuviera algo alojado en el ojo.

Edemas: hinchazón o inflamación blanda de una parte del cuerpo producida por acumulación de líquido.

Equimosis: también llamado morete, es una lesión subcutánea caracterizada por depósitos de sangre extravasada debajo de la piel intacta.

Escalofríos: temblor fino con la finalidad de producir calor.

Exantema: erupción que aparece en la piel como manchas finas de color rojo.

Febrícula: síndrome caracterizado por la elevación de la temperatura corporal entre 37 y 37.5 °C.

Fiebre: síndrome caracterizado por la elevación de la temperatura corporal arriba de 37.5 °C, con aceleración del pulso y la respiración, sequedad en la boca y a veces delirio.

Fotofobia: malestar ocular a la exposición a la luz. Este síntoma se presenta en las afecciones oculares (conjuntivitis, queratitis, etc.) y también en ciertas afecciones cerebrales (meningitis).

Hiperestesia cutánea: aumento de la sensibilidad en la piel.

Ictericia: coloración amarillenta de mucosas y piel.

Insomnio: dificultad para conciliar el sueño cuando se requiere dormir.

Meteorismo: distensión o inflamación del tracto digestivo por gases intestinales.

Mialgia: dolores musculares.

Neuritis: inflamación de un nervio, que puede dar como resultado dolor, aumento de sensibilidad, falta de sensibilidad o sensación de hormigueo en el sector del organismo afectado.

Orquitis: inflamación testicular, causado por infección o traumatismo.

Palpitaciones: sensación de sentir los latidos del corazón.

Petequia: aparición de manchas rojizas u oscuras de pequeño tamaño en la piel.

Somnolencia diurna: sensación de sueño durante el transcurso de la mañana.

Vértigo: trastorno del sentido del equilibrio caracterizado por una sensación de movimiento rotatorio del cuerpo o de los objetos que lo rodean.

Inserto para la detección de anticuerpos IgG contra *Leptospira*

CE



DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.

23961 Craftsman Road, Suite D/E/F, Calabasas, CA 91302

Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383

onestep@rapidtest.com

technicalsupport@rapidtest.com

www.rapidtest.com



See external label



2°C-8°C



Σ=96 tests



Cat # 8204-3

Leptospira IgG

Cat # 8204-3

Test	Leptospira IgG ELISA
Method	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Principle	ELISA-Indirect; Antigen Coated Plate
Detection Range	Qualitative Positive; Negative control
Sample	10 µl serum
Specificity	80%
Sensitivity	88%
Total Time	~ 40 min
Shelf Life	12 Months

DAI Code # 29

1

INTENDED USE

The Diagnostic Automation, Inc. *Leptospira* Microwell ELISA test is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to *Leptospira billexa* (serovar *patoc 1*) for the serological confirmation of infections in serum and plasma. This test is intended to be performed by trained laboratory personnel only.

SUMMARY AND EXPLANATION

The clinical manifestations of leptospirosis range from a mild catarrh-like illness to icteric disease with severe liver and kidney involvement. Natural reservoirs for leptospirosis include rodents as well as a large variety of domesticated mammals. The organisms occupy the lumen of nephritic tubules in their natural host and are shed into the urine. Human infection derives from direct exposure to infected animals (veterinarians, abattoir workers, or dairy workers for example) or by exposure to environments contaminated by animal carriers (e.g. agricultural workers). Bathing or swimming in water sources about which livestock have been pastured has been demonstrated to be a potential infection hazard. The organisms enter the host through skin abrasions, mucosal surfaces or the eye. The incubation period can range from 3 to 30 days but is usually found to be 10 to 12 days. Antibodies can become detectable by the 6th to 10th day of disease and generally reach peak levels within 3 to 4 weeks. Antibody levels then gradually recede but may remain detectable for years. Epidemiologic factors, clinical findings, exposure in endemic regions and other laboratory results should be considered in diagnosing acute disease. Acute disease diagnosis will also include a positive laboratory confirmation in many cases. This test is designed to measure acute infections with *leptospira*. Confirmation of a positive sample by additional methods should be followed.

ASSAY PRINCIPLE

The microwells are coated with purified *Leptospira* Patoc 1 antigen. During the first incubation with the diluted patients' sera, any antibodies which are reactive with the antigen will bind to the coated wells. After washing to remove the rest of the sample, the Enzyme Conjugate is added. If antibodies have been bound to the wells, the Enzyme Conjugate will then bind to these antibodies. After another series of washes, a chromogen (tetramethylbenzidine, or TMB) is added. If the Enzyme Conjugate is present, the peroxidase will catalyze a reaction that consumes the peroxide and turns the chromogen from clear to blue. Addition of the Stop Solution ends the reaction and turns the blue color to a bright yellow color. The reaction may then be read visually or with an ELISA reader.

Item	Description	Symbol
Test Strips	Microwells containing <i>Leptospira</i> antigen - 96 test wells in a test strip holder.	MT PLATE
Conjugate AH IgG (Fc) HRP	One (1) bottle containing 11 ml of anti-human IgG antibody conjugated to peroxidase.	CONJ
Positive Control	One (1) vial containing 1 ml of diluted surrogate positive control.	CONTROL +
Negative Control	One (1) vial containing 1 ml of diluted negative human serum	CONTROL -
TMB Substrate	One (1) bottle containing 11 ml of the chromogen tetramethylbenzidine (TMB).	SUBS TMB
Wash Concentrate (20X)	One (1) bottle containing 25 ml of concentrated buffer and surfactant.	WASH BUF
Milk Dilution Buffer	Two (2) bottles containing 30 ml of buffered protein solution.	SPECM DIL
Stop Solution	One (1) bottle containing 11 ml of 1 M phosphoric acid.	SOLN

STATEMENT OF WARNINGS

1. **Do not deviate from the specified procedures when performing this assay.** All specimen dilutions, incubation times/temperatures and washings have been optimized for the best performance characteristics. Deviations from the specified procedures may affect the sensitivity and specificity of the assay.
2. For In Vitro Diagnostic Use Only.
3. Do not interchange reagents between kits with different lot numbers.
4. Do not use reagents that are beyond their expiration dates. Expiration dates are on each reagent label. Use of reagents beyond their expiration dates may affect results.
5. Unused microwells should be stored in the desiccated pouch to protect them from moisture.
6. Do not use solutions if they precipitate or become cloudy.
Exception: Wash concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will dissolve upon warming.
7. Do not add azides to the samples or any of the reagents.
8. Controls and some reagents contain thimerosal as a preservative, which may be irritating to skin, eyes and mucous membranes. In case of contact, flush eyes or rinse skin with copious amounts of water.
9. Do not use serum that may have supported microbial growth, or is cloudy due to high lipid content. Samples high in lipids should be clarified before use.
10. Treat all reagents and samples as potentially infectious materials. Negative control has been tested and found negative for Hepatitis B surface antigen and for the antibody to HIV in required test methods. Use care to prevent aerosols and decontaminate any spills of samples.
11. Stop solution is a 5% solution of phosphoric acid in water. If spilled on the skin, wash with copious amounts of water. If acid gets into the eyes, wash with copious amounts of water and seek medical attention.
12. Persons who are color blind or visually impaired may not be able to read the test visually and should use spectrophotometric readings to interpret results.

STORAGE

1. Reagents, strips and bottled components should be stored at 2-8 °C
2. Squeeze bottle containing diluted wash buffer may be stored at room temperature (15-25 °C)

PREPARATION

1. Before use, bring all reagents and samples to room temperature (15-25 °C) and mix.
2. (20X) Wash Concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will go back into solution when brought to room temperature and mixed. **Ensure that (20X) Wash Concentrate is completely in solution before diluting to working concentration.** To dilute (20X) wash concentrate to working dilution, remove cap and add contents of one bottle of Wash Concentrate to a squeeze bottle containing 475 ml of DI water. Swirl to mix. Squeeze bottle should have a narrow tip to optimize washings.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The DAI Leptospira Microwell ELISA test should be performed on serum or plasma. Serum may be stored at 2-8 °C for up to five days. Serum may be frozen below -20 °C for extended periods. Do not heat inactivate samples and avoid repeated freezing and thawing of samples.

Single specimens are used to assess exposure; two specimens collected at different times from the same individual are used to show sero-conversion. **Paired specimens should be tested at the same**

time. It is recommended that a convalescent specimen be collected from patients showing either an initially non-reactive result or a weakly reactive result.

PROCEDURE

Materials Provided

DAI Leptospira IgG Microwell ELISA Kit

Materials Required But Not Provided

1. Micropipette
2. Squeeze bottle for washing strips (narrow tip is recommended)
3. Reagent grade (DI) water
4. Graduated Cylinder
5. Sample Dilution Tubes
6. Absorbent paper

Suggested Materials

ELISA plate reader with a 450 nm and a 620-650 nm filter (optional if results are read visually)

Proper Temperature

All incubations are at room temperature (15-25 °C)

TEST PROCEDURE

Notes:

- Ensure all samples and reagents are at room temperature (15-25 °C)
 - When running the assay, try to avoid the formation of bubbles in the wells. Bubbles may affect overall performance and reading of end results. Slapping the wells out on a clean absorbent towel after each step should help to minimize bubbles in the wells.
 - Negative and positive controls are supplied pre-diluted. DO NOT dilute further.
1. Break off number of wells needed (two for controls plus number of samples) and place in strip holder.
 2. Dilute patient sera 1:40 in Dilution Buffer (e.g. 10 µl sera and 390 µl dilution buffer). Add **100 µl** of negative control to well #1, **100 µl** of positive control to well #2 and **100 µl** of the samples to the remaining wells.
 3. Incubate at room temperature for **10 minutes**, then wash.* After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.
 4. Add **2 drops** of Enzyme Conjugate to each well.
 5. Incubate at room temperature for **10 minutes**, then wash.* After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.
 6. Add **2 drops** of the Chromogen to each well.
 7. Incubate at room temperature for **5 minutes**.
 8. Add **2 drops** of the Stop Solution to each well. Mix wells by gently tapping the side of the strip holder with index finger for approximately **15 seconds**.
 9. Read within one hour of adding Stop Solution.

* Washings consist of vigorously filling each well to overflowing and decanting contents three (3) separate times. When possible, avoid formation of bubbles in the wells as this may affect the end results.

READING RESULTS

Visually: Look at each well against a white background (e.g. paper towel) and record as clear or +, ++ or +++ reaction.

ELISA Reader: Zero reader on air. Set for bichromatic readings at 450/620-650 nm.

Quality Control

The use of controls allows validation of kit stability. The kit should not be used if any of the controls are out of range.

Expected values for the controls are:

Negative - 0.0 to 0.3 OD units

Positive - 0.5 OD units and above

Troubleshooting

Negative control has excessive color after development.

Reason: inadequate washings

Correction: wash more vigorously. Remove excessive liquid from the wells by tapping against an Absorbent towel.

Do not allow test wells to dry out.

INTERPRETATION OF THE TEST

Initially Non-reactive: Samples interpreted as non-reactive (0.0-0.3 OD units, or zero color) indicate antibody is not present in the sample. Since antibody may not be present during early disease, (5-8 days incubation), confirmation 2-3 weeks later is indicated for laboratory diagnosis. At this later time, patients showing weak reactions (0.3-1.0 OD or +, ++) should be further tested by alternate methods or re-tested 10-14 days later. A convalescent serum with a significant reaction (>1.0 OD) indicates the formation of specific antibody against leptospira. An initially negative result followed by a positive result implies seroconversion.

Initially Weakly Reactive: Weakly reactive specimens should be cautiously interpreted. In normal populations, weakly reactive samples are infrequent but possible. Confirmation using a sample collected 2-3 weeks later (paired acute and convalescent sera) is recommended. >1.0 OD in the second sample confirms the presence of recent, specific antibody. [Caution: If this is a cross-reactive antibody, the convalescent serum sample may not show a higher antibody level than the acute sample.] If sample reading remains at 0.3-1.0 OD, or +, ++, a second methodology should be considered, or the sample may be interpreted as taken beyond rising titer (titer declining).

Initially Reactive: Samples interpreted as strongly reactive (>1.0 OD or +++) may indicate the presence of specific antibody. Antibody presence alone cannot be used for diagnosis of acute infection, since antibodies from prior exposure may circulate for a prolonged period of time.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Serologic results are an aid in diagnosis but cannot be used as the sole method of diagnosis. The ELISA has been tested against many serovars, but cannot guarantee that all strains will react equally.

Do not use in veterinary samples.

Treatment is often indicated prior to completion of serologic diagnosis, which requires at least two weeks. Acute leptospirosis must be treated immediately and should not wait for serological

confirmation. Diagnosis of leptospira infection should not be made based on results of the ELISA test alone, but in conjunction with other clinical signs and symptoms and other laboratory findings.

Epidemiologic factors, clinical findings, exposure to endemic regions, and other laboratory results should be considered when making a diagnosis.

Many strains and serovars of leptospira are known. Many of the strains are geographically dominant in some areas and not in others. Biflexa Patoc 1 is known to cross react with most serovars **but usually does not cross-react with animal strains**. The relative strength of the reactions may vary by antigen. This must be considered during interpretation. Use of culture or the MAT test is recommended for confirmation as these test are serovar specific. Since serological assay methods may yield different results for weakly reactive samples, a second serological method (i.e. an alternative method that separately identifies IgM and IgG antibody) is recommended.

EXPECTED VALUES

The number of antibody positive subjects in a population depends on two factors: disease prevalence and clinical criteria used to select the tested population. Because very few positives should be seen in a randomly screened population in a non-endemic area, most serology tests are not specific enough to screen non-endemic populations. Even in an endemic region, serology screening often yields many false positives if used to randomly screen patients. Serology tests are useful to test patients in an endemic region with signs and symptoms consistent with the disease.

Antibody levels are generally low or absent during very early infection. Symptomatic patients may have no antibody during the first 1-2 weeks after exposure and the antibody titer will rise with time.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

DAI		Reference Method	
		+	-
DAI	+	8	4
	-	2	28

Positive Agreement: 80% (8/10)

Negative Agreement: 87.5% (28/32)

*Reference Method refers to a commercially available ELISA.

REFERENCES

1. Kelly PW. Leptospirosis. *In*, Infectious disease in medicine and surgery. Gorbach S, Bartlett J, Baicklow N, (eds): Philadelphia, Saunders, 1991, pp.1295-1302.
2. Ribeiro MA, Assis CSN, Romero EC. Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* 1994; 6:140-144.
3. Turner LH. Leptospirosis II. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene* 1968; 62:880-889.
4. Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, et. al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: Comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(2):346-354.
5. Alder B, Murphy AM, Locarnini SA, et.al. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and immunoglobulin G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Micro* 1980; 11:452-457.
6. Cinco M, Balanzini D, Banfi E. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of

- leptospirosis in Italy. Eur. J. Epidemiology 1992; 8:677-682.
7. Ribeiro MA, Sousa CC, Almeida SHP. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 98:452-456.
 8. Gussenhoven GC, van der Hoorn M, Goris M, et. al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J. Clin. Micro. 1997; 35(1):92-97.
 9. Watt G, Alquiza LM, Padre LP, et. al. The rapid diagnosis of leptospirosis: A prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. J. Infect. Dis. 1988; 157(4):840-842.
 10. Levett PN, Branch SL, Paxton H. Prospective Evaluation of Dot-ELISA Method for Detection of Acute Leptospirosis. Abstract of the 37th ICAAC (ASM) 1997; D-4: 83.

Date Adopted	Reference No.
2007-08-01	DA-Leptospira IgG-2011p



DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.
 23961 Craftsman Road, Suite D/E/F, Calabasas, CA 91302
 Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383
 ISO 13485-2003



Revision Date: 06/24/2011

Inserto para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira*

CE



DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.

23961 Craftsman Road, Suite D/E/F, Calabasas, CA 91302


Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383


onestep@rapidtest.com


technicalsupport@rapidtest.com

www.rapidtest.com

IVD

 See external label

 2°C-8°C

 Σ=96 tests

REF

Cat # 8208-3

Leptospira IgM

Cat # 8208-3

Intended Use

The DAI LEPTOSPIRA IgM Microwell ELISA test is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to *Leptospira biflexa* (serovar *patoc 1*) for the serological confirmation of infections in serum, and plasma. This test is intended to be performed by trained laboratory personnel only.

Summary And Explanation

The clinical manifestations of leptospirosis range from a mild catarrh-like illness to icteric disease with severe liver and kidney involvement. Natural reservoirs for leptospirosis include rodents as well as a large variety of domesticated mammals. The organisms occupy the lumen of nephritic tubules in their natural host and are shed into the urine. Human infection derives from direct exposure to infected animals (veterinarians, abattoir workers, or dairy workers for example) or by exposure to environments contaminated by animal carriers (e.g. agricultural workers). Bathing or swimming in water sources about which livestock have been pastured has been demonstrated to be a potential infection hazard. The organisms enter the host through skin abrasions, mucosal surfaces or the eye. The incubation period can range from 3 to 30 days but is usually found to be 10 to 12 days. Antibodies can become detectable by the 6th to 10th day of disease and generally reach peak levels within 3 to 4 weeks. Antibody levels then gradually recede but may remain detectable for years.

Epidemiologic factors, clinical findings, exposure in endemic regions, and other laboratory results should be considered in diagnosing acute disease. Acute disease diagnosis will also include a positive laboratory confirmation in many cases. This test is designed to measure acute infections with leptospira. Confirmation of a positive sample by additional methods should be followed.

DAI Code # 3

1

Assay Principle

The microwells are coated with purified leptospira Patoc 1 antigen. During the first incubation with the diluted patients' sera, any antibodies which are reactive with the antigen will bind to the coated wells. After washing to remove the rest of the sample, the Enzyme Conjugate is added. If antibodies have been bound to the wells, the Enzyme Conjugate will then bind to these antibodies. After another series of washes, a chromogen (tetramethylbenzidine, or TMB) is added. If the Enzyme Conjugate is present, the peroxidase will catalyze a reaction that consumes the peroxide and turns the chromogen from clear to blue. Addition of the Stop Solution ends the reaction and turns the blue color to a bright yellow color. The reaction may then be read visually or with an ELISA reader.

Reagents

Item	Description	Symbol
Test Strips	Microwells containing Leptospira antigen - 96 test wells in a test strip holder.	MT PLATE
Enzyme Conjugate	One (1) bottle containing 11 ml of anti-human IgM antibody conjugated to peroxidase.	CONJ
Positive Control	One (1) vial containing 1 ml of diluted positive IgM human serum.	CONTROL +
Negative Control	One (1) vial containing 1 ml of diluted negative human serum	CONTROL -
Chromogen	One (1) bottle containing 11 ml of the chromogen tetramethylbenzidine (TMB).	SUBS TMB
RF Absorbent	One (1) bottle containing 5 ml of goat anti-human IgG.	Ab
Wash Concentrate (20X)	One (1) bottle containing 25 ml of concentrated buffer and surfactant.	WASH BUF
Dilution Buffer	Two (2) bottles containing 30 ml of buffered protein solution.	SPECM DIL
Stop Solution	One (1) bottle containing 11 ml of 1 M phosphoric acid.	SOLN

Statement Of Warnings

Do not use solutions if they precipitate or become cloudy. Wash concentrate may show crystallization upon storage at 2-8 °C. Crystallization will disappear after dilution to working strength. Dilution buffer is a colloidal solution. It will appear opaque and have a precipitate form. Do not use serum that may have supported microbial growth, or is cloudy due to high lipid content. Samples high in lipids should be clarified before use.

Treat all sera as if capable of being infectious. Negative control and positive control has been tested and found negative for Hepatitis B surface antigen and for the antibody to HIV by required test methods.

This product should be used under appropriate safety conditions that would be used for any potentially infectious agent. Do not add azide to any of the kit reagents.

Storage

Reagents, strips and bottled components:

Store between 2 – 8 °C.

Squeeze bottle containing diluted wash buffer may be stored at room temperature.

Warning - Potential Bio-Hazardous Material

Sera used for positive and negative controls (available separately) are tested by an FDA approved method for the presence of the antibody to human immunodeficiency virus (HIV) as well as for hepatitis B surface antigen and found to be negative (not repeatedly reactive). Because no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens as well as controls should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen.

Specimen Collection And Handling

The DAI Leptospira Microwell ELISA test should be performed on serum. Serum may be stored at 2-8 °C for up to five days. Serum may be frozen below -20 °C for extended periods. Freezing whole blood samples is not advised.

Single specimens are used to assess exposure; two specimens collected at different times from the same individual are used to show sero-conversion. **Paired specimens should be tested at the same time.** It is recommended that a convalescent specimen be collected from patients showing either an initially non-reactive result or a weakly reactive result.

Materials Provided

DAI Leptospira IgM Microwell ELISA Kit

Materials Required But Not Provided

1. Pipettes
2. Squeeze bottle for washing strips (narrow tip is recommended)
3. Reagent grade water and graduated cylinder
4. Tubes for sample dilution
5. Absorbent paper

Suggested Materials

ELISA plate reader with a 450 nm and a 620 - 650 nm filter (optional if results are read visually)

Procedure

Wash Buffer - Remove cap and add contents of bottle to 475 ml of reagent grade water. Place diluted wash buffer into a squeeze bottle with a narrow tip opening.

Note: Washings consist of filling to the top of each well, shaking out the contents and refilling.

Avoid generating bubbles in the wells during the washing steps.

Coagulate blood and remove serum. Freeze sample at -20 °C or lower if not used within five days.

Do not heat inactivate serum and avoid repeated freezing and thawing of samples.

Test samples: Make a 1:40 dilution of patients' sera using the dilution buffer (e.g. 10 µl sera and 390 µl dilution buffer).

Performance Of Tests

1. Break off number of wells needed (two for controls plus number of samples) and place in strip holder.
2. Note: Negative and positive controls are supplied pre-diluted. Do not dilute further.
Dilute patient sera 1:40 IN DILUTION BUFFER. To 100 µl of diluted serum add 40 µl of RF Absorbent. Mix well. Incubate in tube for 5 minutes. DO NOT add RF Absorbent to negative and positive controls. Add 100 µl of negative and positive control to wells #1 and #2 respectively after first five minute incubation. Transfer all 140 µl of test samples to the remaining wells.
3. Incubate at room temperature (15 to 25 °C) for 10 minutes.
4. Shake out contents and wash 3 times with the diluted wash buffer.
5. Add 2 drops of Enzyme Conjugate to each well.
6. Incubate at room temperature for 10 minutes.
7. Shake out contents and wash 3 times with wash buffer.
8. Slap wells against paper towels to remove all liquid.
9. Add 2 drops of the Chromogen to every well.
10. Incubate at room temperature for 5 minutes.
11. Add 2 drops of the Stop Solution and mix by tapping strip holder.
12. Read within one hour of adding Stop Solution.

Reading Results

Visually: Look at each well against a white background (e.g. paper towel) and record as clear or +, ++ or +++ reaction.

ELISA Reader: Zero reader on air. Set for bichromatic readings at 450/620-650 nm.

Quality Control

The use of controls allows validation of kit stability. The kit should not be used if any of the controls are out of range.

Expected values for the controls are:

Negative - 0.0 to 0.3 OD units
Positive - 0.5 OD units and above

Troubleshooting

Negative control has excessive color after development.

Reason: inadequate washings

Correction: wash more vigorously. Remove excessive liquid from the wells by tapping against an Absorbent towel.

Do not allow test wells to dry out.

lis T130011

Interpretation Of The Test

Initially Non-reactive: Samples interpreted as non-reactive (0.0-0.3 OD units, or zero color) indicate antibody is not present in the sample. Since antibody may not be present during early disease, (5-8 days incubation), confirmation 2-3 weeks later is indicated for laboratory diagnosis. At this later time, patients showing weak

reactions (0.5 - \leq 1.0 or +, ++) should be further tested by alternate methods or re-tested 10-14 days later. A convalescent serum with a significant reaction ($>$ 1.0 OD) indicates the formation of specific antibody against leptospira. An initially negative result followed by a positive result implies seroconversion.

Initially Weakly Reactive: Weakly reactive specimens should be cautiously interpreted. In normal populations, weakly reactive samples are infrequent but possible. Confirmation using a sample collected 2-3 weeks later (paired acute and convalescent sera) is recommended. $>$ 1.0 OD in the second sample confirms the presence of recent, specific antibody. [Caution: If this is a cross-reactive antibody, the convalescent serum sample may not show a higher antibody level than the acute sample.] If sample reading remains at \geq 0.5 - \leq 1.0 OD, or +, ++, a second methodology should be considered, or the sample may be interpreted as taken beyond rising titer (titer declining).

Initially Reactive: Samples interpreted as strongly reactive ($>$ 1.0 OD or +++ or $>$) may indicate the presence of specific antibody. Antibody presence alone cannot be used for diagnosis of acute infection, since antibodies from prior exposure may circulate for a prolonged period of time.

Limitations Of The Procedure

Serologic results are an aid in diagnosis but cannot be used as the sole method of diagnosis. The ELISA has been tested against many serovars, but cannot guarantee that all strains will react equally.

Do not use in veterinary samples.

Treatment is often indicated prior to completion of serologic diagnosis, which requires at least two weeks. Acute leptospirosis must be treated immediately and should not wait for serological confirmation. Diagnosis of leptospira infection should not be made based on results of the ELISA test alone, but in conjunction with other clinical signs and symptoms and other laboratory findings.

Epidemiologic factors, clinical findings, exposure to endemic regions, and other laboratory results should be considered when making a diagnosis.

Many strains and serovars of leptospira are known. Many of the strains are geographically dominant in some areas and not in others. Biflexa Patoc 1 is known to cross react with most serovars **but usually does not cross-react with animal strains**. The relative strength of the reactions may vary by antigen. This must be considered during interpretation. Use of culture or the MAT test is recommended for confirmation as these tests are serovar specific.

Since serological assay methods may yield different results for weakly reactive samples, a second serological method (i.e. an alternative method that separately identifies IgM and IgG antibody) is recommended.

Expected Values

The number of antibody positive subjects in a population depends on two factors: disease prevalence and clinical criteria used to select the tested population. Because very few positives should be seen in a randomly screened population in a non-endemic area, most serology tests are not specific enough to screen non-endemic populations. Even in an endemic region, serology screening often yields many false positives if used to randomly screen patients. Serology tests are useful to test patients in an endemic region with signs and symptoms consistent with the disease.

Antibody levels are generally low or absent during very early infection. Symptomatic patients may have no antibody during the first 1-2 weeks after exposure and the antibody titer will rise with time.

Specific Performance Characteristics

A total 50 serum samples were tested against another commercial ELISA. The following results were obtained.

	ELISA +	ELISA -
DAI ELISA +	11	4
DAI ELISA -	0	35

Sensitivity: 100% (11/11)

Specificity: 90% (35/39)

References

1. Kelly PW. Leptospirosis. *In*, Infectious disease in medicine and surgery. Gorbach S, Bartlett J, Balcklow N, (eds): Philadelphia, Saunders, 1991, pp.1295-1302.
2. Ribeiro MA, Assis CSN, Romero EC. Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* 1994; 6:140-144.
3. Turner LH. Leptospirosis II. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene* 1968; 62:880-889.
4. Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, et. al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: Comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(2):346-354.
5. Alder B, Murphy AM, Locarnini SA, et.al. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and immunoglobulin G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Micro* 1980; 11:452-457.
6. Cinco M, Balanzini D, Banfi E. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy. *Eur. J. Epidemiology* 1992; 8:677-682.
7. Ribeiro MA, Sousa CC, Almeida SHP. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. *J. Trop.Med. Hyg.* 1995; 98:452-456.
8. Gussenhoven GC, van der Hoorn M, Goris M, et. al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J. Clin. Micro.* 1997; 35(1):92-97.
9. Watt G, Alquiza LM, Padre LP, et. al. The rapid diagnosis of leptospirosis: A prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J. Infect. Dis.* 1988; 157(4):840-842.
10. Levett PN, Branch SL, Paxton H. Prospective Evaluation of Dot-ELISA Method for Detection of Acute Leptospirosis. Abstract of the 37th ICAAC (ASM) 1997; D-4: 83.

Date Adopted	Reference No.
2007-09-01	DA-Leptospira IgM-2008

 **DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.**
23961 Craftsman Road, Suite D/E/F, Calabasas, CA 91302
Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383
ISO 13485-2003



Revision Date: 6/23/08