

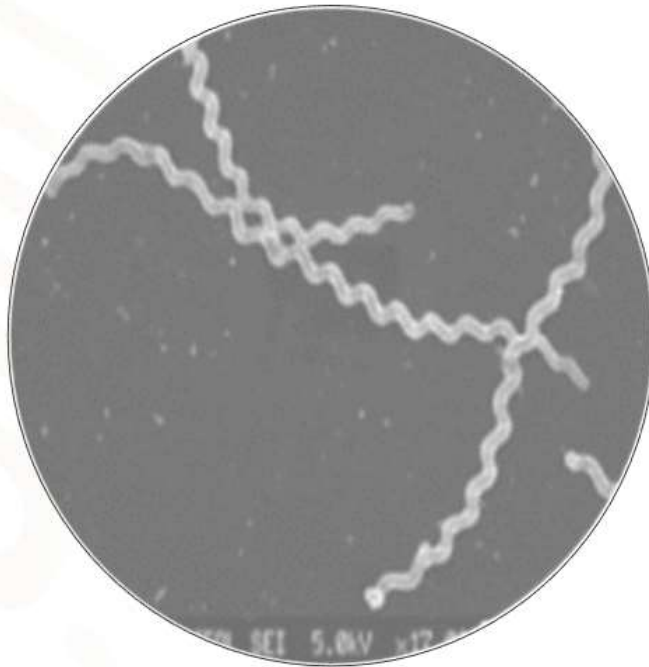


**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

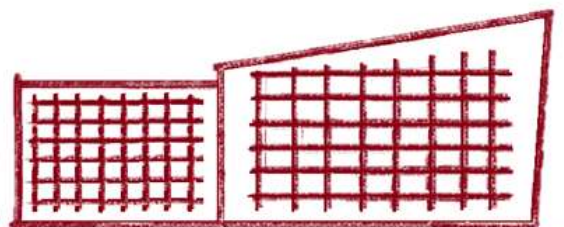
# Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Leptospirosis



Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

**INDRE**

**InDRE**



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"



# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA LEPTOSPIROSIS

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2018

PRIMERA EDICIÓN. 2018

INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CoNAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA LEPTOSPIROSIS. INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2018"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,  
CIUDAD DE MÉXICO.

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA,

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS LEPTOSPIROSIS A TRAVÉS DEL CORREO: [carina.brito@salud.gob.mx](mailto:carina.brito@salud.gob.mx) y [juan.roman@salud.gob.mx](mailto:juan.roman@salud.gob.mx) CON EL ASUNTO: REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

# SECRETARÍA DE SALUD

## **Dr. Jorge Alcocer Varela**

SECRETARIO DE SALUD

## **Dra. Asa Cristina Laurell**

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

## **Dr. Hugo López-Gatell Ramírez**

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

## **Dr. José Luis Alomía Zegarra**

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS  
"DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
INDRE

**Biól. Irma López Martínez**

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

**Mtra. Lucía Hernández Rivas**

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

**Lic. Adriana Castro Cabrera**

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

**Biól. Norma Angélica Montes Colima**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

**Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

**Mtra. Judith Estévez Ramírez**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

**Mtro. Hiram Olivera Díaz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

**Dra. Clara Gorodezky Lauferman**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**Mtra. Mónica Salas García**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Dra. Gabriela Meneses Ruiz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

## GRUPO DE TRABAJO

M EN C. CARINA BERENICE BRITO LORÁN

JEFA DEL LABORATORIO DE LEPTOSPIROSIS Y RICKETTSIOSIS

COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE DIAGNÓSTICO DE SALUD PÚBLICA PARA LA  
VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS

QBP MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ ROMERO

QBP GUADALUPE ADRIANA GALICIA NICOLÁS

QBP MARÍA DOLORES TÉLLEZ SAUCEDO

## CONTENIDO

CONTENIDO	8
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	11
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	11
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leptospirosis	12
MARCO LEGAL	12
DEFINICIONES OPERACIONALES	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS	16
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS	17
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	17
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	18
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	19
Toma de muestra	20
Conservación	20
Envío y transporte	21
Criterios de aceptación y rechazo	22
ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	24
CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	25
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	26



CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSIPIROSIS	28
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO	28
BIBLIOGRAFIA	30
ANEXOS	31
Anexo I: Bioseguridad	31
Anexo II: Técnicas diagnósticas	32
Anexo III: Preparación de reactivos	42
Anexo IV: Imágenes de Portada	58

# INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución a nivel mundial. Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas *Leptospiras* que son transmitidas, directa o indirectamente, desde los animales a los seres humanos. Estos son huéspedes ocasionales y los reservorios animales incluyen roedores, en su mayoría, los cuales excretan *Leptospiras* en orina; contaminando el medio ambiente y transmitiendo la enfermedad a otros animales o a humanos, la transmisión entre estos últimos ocurre muy raramente.

La leptospirosis se conoce también por otros nombres tales como: enfermedad de Weil (*L. icterohaemorrhagiae*), fiebre de los arrozales (*L. bataviae*), enfermedad de los heneficadores; enfermedad de los porqueros (*L. pomona*), enfermedad de los manipuladores de pescados, ictericia enzootica; enfermedad de Stuttgart (*L. canicola* en Europa), ictericia hemorrágica; ictericia infecciosa; agua roja; fiebre de los 7 días (*L. hebdomadis* en Japón), fiebre otoñal japonesa (*L. autumnalis*), fiebre Canicola, fiebre del barro, enfermedad de Swineherd.

Es una enfermedad que ocurre en todo el mundo, pero es más común en las áreas tropicales y subtropicales con altos índices de precipitación, tal como ocurre en gran parte del territorio del país. La enfermedad se encuentra en cualquier lugar en donde los humanos entran en contacto con la orina de animales infectados o un ambiente en contacto con orina contaminada.

El número de casos humanos que ocurren mundialmente no es conocido con precisión. De acuerdo con los informes disponibles, la incidencia anual varía dentro en un rango que va desde, aproximadamente 0.1-1 por cada 100,000 habitantes en climas templados y hasta 10-100/100,000 habitantes en climas húmedos tropicales.

Cuando se producen brotes, y en grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 casos por 100,000 habitantes. Sin embargo se considera que estas son cifras subestimadas ya que la enfermedad puede confundirse fácilmente con una variedad de padecimientos debido a que puede presentarse con una diversidad de manifestaciones clínicas que pueden variar desde una enfermedad pseudo gripal leve hasta una enfermedad seria que puede llegar a ser fatal. La

leptospirosis también puede mimetizarse y confundirse clínicamente con otras enfermedades, como por ejemplo el dengue y otras enfermedades hemorrágicas virales.

La ictericia, es un síntoma relativamente común en leptospirosis pero que también puede ser encontrado en otras enfermedades que involucran el hígado como las diversas formas de hepatitis. Otros síntomas son menos comunes y no son reconocidos como posibles indicadores de una infección por *Leptospiras*. El diagnóstico es confirmado con pruebas de laboratorio, pero estas no están siempre disponibles, especialmente en países en desarrollo.

Existen diferentes clasificaciones de las *Leptospiras*, una de ellas es basada en el concepto de *serovar*, que es la unidad de agrupación taxonómica de acuerdo a sus afinidades antigénicas. Se han descrito alrededor de 200 serovares patógenos, que han sido agrupados en 25 serogrupos con base a sus similitudes antigénicas. Cepas distintas, con pequeñas diferencias antigénicas, pueden algunas veces encontrarse dentro de ciertos serovares. Tiene importancia epidemiológica ya que un determinado serovar puede desarrollar una relación comensal o de leve patogenicidad con determinada especie animal. Por ejemplo, el ganado vacuno es a menudo asociado con el serovar *hardjo*, los perros con *canicola* y las ratas con *icterohemorrágica* y *copenhageni*.

## ANTECEDENTES

### Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica que genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP depende de la Secretaría de Salud, está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”

(InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública* Componente Vigilancia Epidemiológica.

El Marco Analítico Básico de la RNLSP consta de 27 algoritmos, siendo el diagnóstico de la leptospirosis uno de ellos.

## Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leptospirosis

El diagnóstico de Leptospirosis, se comenzó a realizar en el año 1993, cuando el “Departamento de Bacteriología y Micología” estaba integrado por los laboratorios de Cólera y Bacterias Entéricas, Infecciones Respiratorias Agudas, Brucela, y Enfermedades de Transmisión Sexual.

El InDRE es el órgano rector de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), esta cuenta con Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). En México las acciones de vigilancia epidemiológica se apoyan en la RNLSP a través de la vigilancia por laboratorio.

## MARCO LEGAL

### Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/02/1917, Última Reforma D.O.F. 15/08/2016.

### Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada D.O.F. 01/06/2016.
- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/03/2012. Última reforma en D.O.F. 28/05/2009
- DECRETO por el que se expide la Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; la Ley General de Responsabilidades Administrativas, y la Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F. 18/07/2016-
- DECRETO por el que se expide la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 13/12/2016.

### **Reglamentos**

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004. Última reforma publicada en el D.O.F. del 10 de enero de 2011.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

### **Normas Oficiales Mexicanas**

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, D.O.F. 19 /02/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la Leptospirosis. (DOF: 30/06/2000)
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico infecciosos clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015

## Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Diario Oficial de la Federación, D.O.F. 20/05/2013.
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2013-2018. Diario Oficial de la Federación D.O.F. 12/12/2013.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2014.

## Lineamientos y Manuales

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2015
- Secretaría de Salud, Manual metodológico Caminando a la Excelencia. México 2015.

## DEFINICIONES OPERACIONALES

Estas definiciones operacionales son tomadas del Manual de Procedimientos Estandarizados para la vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis de la Dirección General de epidemiología, disponible en:

- **Caso sospechoso de leptospirosis:** persona con antecedentes de contacto con animales que realiza actividades que lo ponen en contacto con el agente y presenta sintomatología sugestiva de la enfermedad.
- **Para Caso confirmado positivo de Leptospirosis:** todo caso probable con prueba de laboratorio confirmatoria avalada por el órgano normativo positiva a Leptospira.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), los procedimientos de diagnóstico, control de calidad y referencia para el diagnóstico de la Leptospirosis.

### Objetivos Específicos

- Ser el documento guía para la RNLSP en el ámbito técnico-científico del diagnóstico por laboratorio de Leptospirosis
- Definir los procedimientos para realizar un diagnóstico de la Leptospirosis homogéneo, confiable y de calidad.

### Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Leptospirosis.

# RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS

Actualmente la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de la Leptospiriosis cuenta con 19 laboratorios estatales que realizan la técnica serológica de Microaglutinación (MAT) y 6 que realizan la técnica de PCR en tiempo real (ver figura 1), además del Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional La Raza como Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica. En el InDRE se realiza el diagnóstico para el resto de los estados que están en proceso de incorporarse a dicha red, así mismo recibe muestras para realizar el control de calidad de la RNLSP (10% indeterminadas, 100% de positivas y 100% de negativas) y referencia. En el InDRE se realiza el diagnóstico serológico con un panel que fue donado en parte por el Instituto Oswaldo Cruz de Brasil en el año 2009 y otro por los Centros para Control de Enfermedades (CDC) en 2015. Los laboratorios estatales solo trabajan aquellos serovares con mayor prevalencia en su región, y es su responsabilidad hacer el análisis para elegirlos. Cada año se renueva dicho panel para toda la red, pudiendo variar los serovares solicitados.



Figura. 1. Red Nacional de Leptospiriosis. En gris las entidades con Laboratorios Estatales de Salud Pública integrantes de la Red



## Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leptospirosis

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leptospirosis está encabezada por el Laboratorio de Leptospirosis adscrito al departamento de Bacteriología del InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) y se integra por los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los LAVE que realizan el diagnóstico con la técnica de Aglutinación microscópica (MAT) o Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a los cuales el InDRE evalúa a través del control de calidad y paneles de evaluación de desempeño.

## FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS

### Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Realizar el diagnóstico siguiendo los presentes lineamientos y de acuerdo a la técnica que hayan sido capacitados y autorizados por el LNR.
- En caso de no contar con autorización para realizar alguna técnica del diagnóstico de Leptospirosis, enviar el 100% de las muestras recibidas al LNR, revisando previamente que cumplan con los criterios de aceptación correspondientes.
- Enviar muestras al InDRE para control de calidad y referencia (los porcentajes de las mismas dependerán de los resultados obtenidos en las evaluaciones de cada laboratorio) junto con la información del resultado obtenido por el LESP y número de muestra, así como copia del formato de información clínica-epidemiológica del paciente.
- Verificar que la calidad de las muestras recibidas para diagnóstico cumplan con los criterios de aceptación.
- Verificar que la documentación anexa a las muestras recibidas esté completamente llena.
- Llenar la base de datos de información de las muestras recibidas para el diagnóstico, misma que solicita el Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis (previo envío del archivo electrónico) y enviarla mensualmente al mismo sin modificar el formato.

- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio.
- Solicitar en tiempo al LNR, y de acuerdo a calendario, los serovares y controles requeridos para realizar el diagnóstico.
- Elegir el panel de serovares incluyendo mínimamente a los previamente detectados como prevalentes en el estado correspondiente.
- Solicitar al InDRE el panel de serovares como mínimo cada inicio de año y con mínimo 6 serovares.
- Participar en el Programa de Evaluación Externa del Desempeño.
- Aprobar el resultado del Panel de eficiencia enviado por el LNR con un valor mayor o igual al 80%, de lo contrario hacer un análisis causa-raíz, establecer las acciones necesarias y darle seguimiento (enviar al InDRE toda la evidencia).
- Notificar al LNR cuando exista personal de nuevo ingreso, cuando suspendan y re-inicien el diagnóstico.
- Capacitar al personal de nuevo ingreso.
- Asistir a capacitación en servicio en el InDRE cuando llegue un nuevo integrante al proceso de diagnóstico que no haya podido ser capacitado por alguien previamente autorizado por el InDRE.
- Realizar el diagnóstico de manera homogénea con la RNLSP siguiendo las directrices.
- Conocer y aplicar los Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Leptospirosis, así como difundirlos a todos los niveles implicados.
- Aplicar la información que le haga llegar el InDRE con respecto al diagnóstico de Leptospirosis y difundirla a todos los niveles implicados.

### **Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia**

El laboratorio de Leptospirosis del InDRE, es el LNR y el órgano normativo para el diagnóstico, las funciones que le competen son:

- Coordinar las actividades de la RNLSP en materia de diagnóstico por laboratorio de la Leptospirosis.
- Realizar de manera transitoria el diagnóstico por Laboratorio de Leptospirosis, si algún LESP, temporalmente no puede realizarlo, de

acuerdo a las especiaciones descritas en los Criterios de Operación de la Red Nacional de Laboratorio de Salud Pública.

- Realizar el control de calidad y referencia a los LESP.
- Capacitar a los LESP en el diagnóstico de Leptospirosis.
- Asesorar y dar soporte a la RNLSP respecto al diagnóstico de Leptospirosis por MAT.
- Resguardar el banco de serovares de Leptospiras, así como de controles y proveer a la red con los mismos.
- Conducir el “Programa de Evaluación Externa del Desempeño” (PEED) para la RNLSP en el diagnóstico de Leptospirosis.
- Proporcionar asesorías técnicas y capacitación a todos aquellos LESP que deseen unirse a la red nacional de diagnóstico de Leptospirosis para que cumplan con los requerimientos necesarios.
- Participar en la revisión y actualización de la normatividad referente a las técnicas de diagnóstico de Leptospirosis en México, así como otros documentos relacionados.
- Recopilar, analizar y evaluar la información de las actividades realizadas por la RNLSP en materia de Leptospirosis.

## TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

### Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Una muestra biológicamente adecuada se define como la muestra representativa del sitio de la lesión a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado y limpio, identificada, conservada y transportada correctamente.

## Toma de muestra

La toma de la muestra deberá realizarse con pacientes en ayunas, en un lugar perfectamente iluminado y con el paciente cómodamente sentado. Este deberá efectuarse por personal capacitado y autorizado para la toma de muestras. Deberá localizar una vena adecuada en la cara anterior del codo y colocar el torniquete en la parte media del brazo.

Desinfectar el área con un algodón humedecido con alcohol al 70% e introducir la aguja con el bisel hacia arriba. Si la sangre no fluye espontáneamente presionar el tubo de ensaye hacia arriba.

Al empezar a fluir la sangre retirar el torniquete y una vez que se haya obtenido la cantidad de sangre requerida; 5-7 mL, retirar la aguja y colocar una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener el sangrado. Para la obtención de suero usar tubo sin anticoagulante (tubo Vacutainer® de tapón rojo o amarillo).

## Conservación

Para hacer la separación de suero, una vez tomada la muestra dejar el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la retracción del coágulo, separar el coágulo formado con un aplicador de madera estéril y dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II, centrifugar a 2,500-3,000 rpm durante 10 min.

Colocar el suero en tubos estériles de plástico, preferentemente de 1.5 mL (de no contar con ese tamaño usar otro que sea también estéril y plástico) con tapón de rosca y si muestra indicios de contaminación debe desecharse de inmediato (realizar este paso dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II), rotular y sellar correctamente con papel parafinado, si no cuenta con la infraestructura para realizar la separación del suero puede enviar el tubo con el que se realizó la toma, resguardando a 4 °C. Enviar las muestras en una

hielera, colocadas verticalmente en una gradilla a  $4\pm 2$  °C debidamente rotuladas y selladas

Para la obtención de sangre completa hay que utilizar un tubo tipo Vacutainer®, de preferencia de tapón azul con citratos como anticoagulante o en su defecto un tubo tipo Vacutainer® de tapón lila con EDTA, una vez tomada la muestra hay que homogenizar por inversión y colocar en una gradilla.

En caso de biopsias, el transporte de estas debe de efectuarse en frascos perfectamente sellados y en una hielera que contenga geles refrigerantes para mantener la temperatura interior entre 2 a 6 °C y evitar que los frascos se vuelquen y puedan derramarse. Estas deben de ser enviadas en solución salina, el volumen debe de ser 10 veces el tamaño de la muestra de tejido. Condiciones de toma y envío más detalladas por tipo de muestra se pueden consultar en la Tabla 1.

## **Envío y transporte**

La muestra debe ser enviada al laboratorio de procesamiento junto con el Estudio epidemiológico de caso (Estudio Epidemiológico SUIVE-2), descrito en el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis completamente lleno y con información verídica.

Tabla 1. Condiciones de toma y envío y criterios particulares de aceptación por tipo de muestra.

Técnica	Muestra	Condiciones de toma y envío	Criterios particulares de aceptación
MAT	Suero	La primera muestra se toma preferentemente en la etapa aguda de la enfermedad. La segunda muestra se toma después de 15 días y antes de 90 respecto a la primera.	- Volumen mínimo 500 microlitros - Es importante que la muestra no esté hemolizada, lipémica o contaminada - Tubo de plástico u otro material que no se rompa, de cierre hermético.
PCR	Sangre total	El paciente debe encontrarse en la etapa aguda de la enfermedad (preferentemente dentro de los primeros diez días naturales de cuadro clínico, o puede ser mayor si la situación del paciente continúa muy grave o crítica).	- Volumen de 3 a 5 mililitros - Anticoagulante, preferentemente citratos, heparina u oxalato de sodio - Tubo de plástico u otro material que no se rompa y de cierre hermético.
	Órgano	Hígado, corazón, riñón, cerebro, bazo, pulmón, etc. Tomada preferentemente en la etapa aguda de la enfermedad.	- Tamaño: 3 x 3 x 1 cm - Contenido en solución salina fisiológica estéril y en envase estéril de plástico (u otro material que no se rompa) con boca ancha y tapa de rosca, herméticamente cerrado y de tamaño que permita la fácil extracción del tejido.

## Criterios de aceptación y rechazo

### Criterios generales de aceptación:

- Concordancia entre información documental y contenedor primario
- Contenedor de dimensiones adecuadas para manipular el tipo de muestra, cerrado herméticamente.
- Cumplimiento del tiempo de tránsito de la muestra:
  - Para muestras de control de calidad, referencia y banco: menos de 2 semanas entre la llegada al Laboratorio de diagnóstico y la llegada al InDRE
  - Para muestras de diagnóstico: menos de 3 semanas entre toma y recepción en el Laboratorio de diagnóstico.
- Muestra con oficio de solicitud de estudio indicando justificación de envío.
- Muestra conservada en red fría (2 a 6°C).

- Muestras enviadas con Estudio epidemiológico de caso debidamente llenado y con información verídica de cada paciente.<sup>1</sup>

#### **Criterios de rechazo:**

- Contenedor primario con muestra derramada
- Contenedor primario sin identificación del paciente
- Contenedor primario sin muestra
- Falta de concordancia entre información documental y contenedor primario de muestra
- Falta de conservación en red fría
- Incumplimiento a las condiciones de toma y envío, Tabla 1
- Incumplimiento a los tiempos de tránsito
- Muestra hemolizada, contaminada, lipémica, con volumen insuficiente
- Muestras sin fecha de toma

#### **Muestras de alto valor o concesionada**

Se considera muestra concesionada o de alto valor a aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación, pero que por las características de evolución del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico.

Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra concesionada se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra de alto valor se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

---

<sup>1</sup> identificación del médico tratante, identificación del caso (nombre del paciente, edad, sexo, lugar de residencia, ocupación, sintomatología completa), datos epidemiológicos que permitan identificar factores de riesgo, indispensable incluir la fecha de inicio de síntomas (debe ser concordante entre primera muestra y las subsecuentes, cuando aplique) y fecha de toma de muestra, así como si se trata de una primera o segunda muestra (cuando aplique) y si el paciente ha recibido tratamiento (incluya nombre del medicamento, dosis y fecha de inicio y término).

## ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico por laboratorio de Leptospirosis por laboratorio se establece el algoritmo mostrado en la Figura 2, el cual incluye las técnicas de MAT y PCR que son complementarias entre sí, requiriendo diferentes matrices con diferentes blancos.

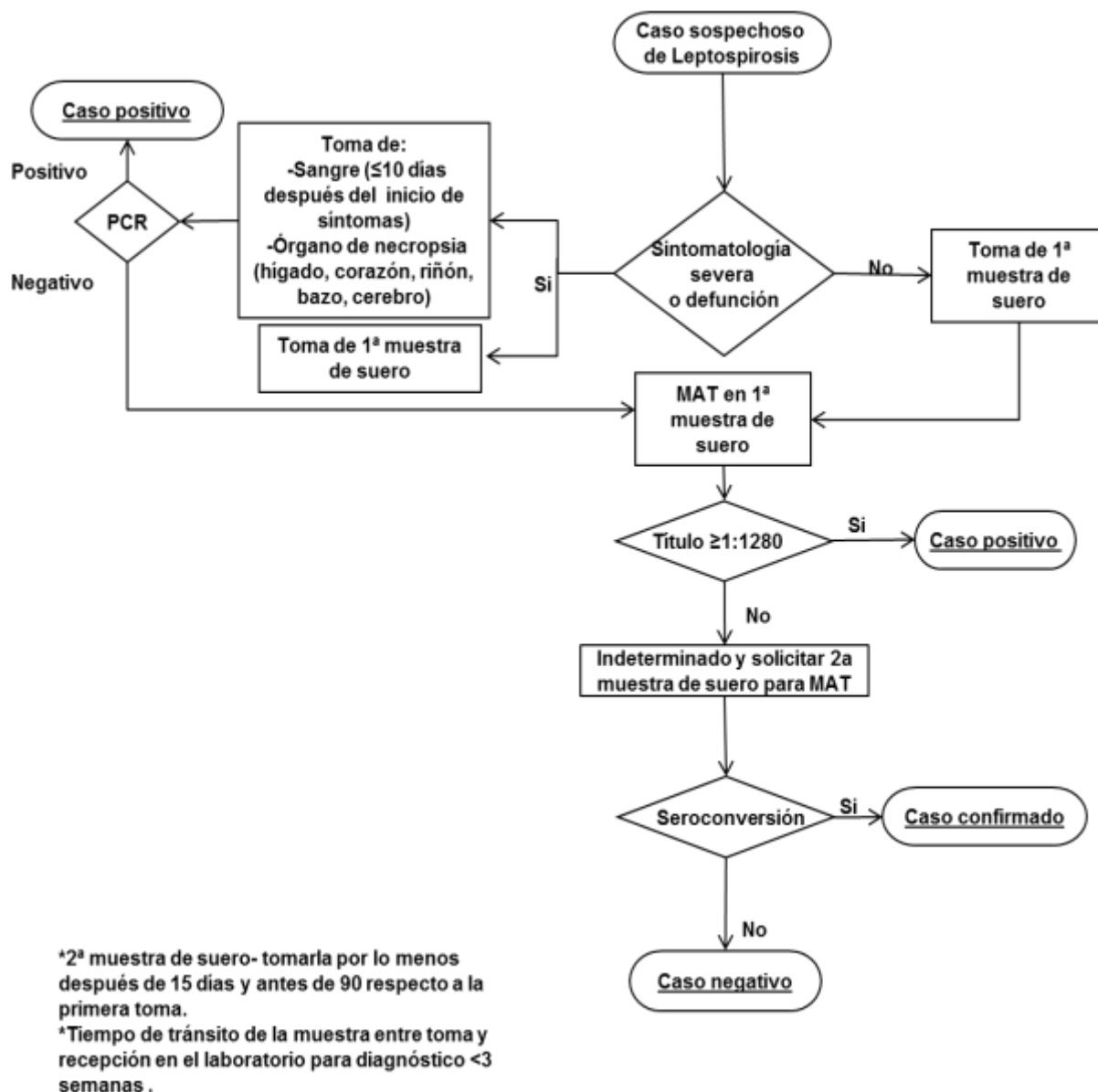


Fig. 2. Algoritmo para el diagnóstico de Leptospirosis, Clave de tabulador: 1B5564002



## CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP-Lepto es indispensable apegarse a los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica*, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (*International Organization for Standardization*) 9001:2015 *Sistemas de Gestión de la Calidad, Requisitos* e ISO 15189:2015 *Requisitos de la calidad y competencia*.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el *Manual Caminando a la Excelencia*, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP-Lepto:

- **Oportunidad en la Toma:** Días transcurridos entre la toma de la muestra para PCR y la fecha del inicio de los síntomas ( $\leq 14$  días).  
**2ª muestra de suero-** tomarla por lo menos después de 15 días y antes de 90 días respecto a la primera toma
- **Oportunidad en el envío:** Días transcurridos entre la toma de la muestra y la recepción de la misma en el laboratorio de procesamiento para diagnóstico (<3 semanas).  
Días transcurridos entre la llegada de la muestra al laboratorio de diagnóstico y la llegada al InDRE para control de calidad, referencia, banco, etc. (<2 semanas).

**Estándar del Servicio:** El estándar de servicio actual en días hábiles es de 7 para muestras de diagnóstico en la RNLSP.

## PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

El PEED tiene como objetivo evaluar el desempeño de los Laboratorios participantes para detectar áreas de oportunidad en los mismos, que puedan ser mejoradas.

Es responsabilidad de cada laboratorio participar en el PEED, mismo que se realiza mediante el análisis de muestras de control de calidad (LESP no liberados) y el envío por el InDRE (todos los LESP) de un panel de eficiencia al año cual consta de 5 sueros para la prueba de MAT, que pueden ser negativos o reactivos a uno o varios serovares, así también el envío de sangres o DNA para PCR, la complejidad y composición específica del panel podrá variar dependiendo de las áreas de oportunidad detectadas en la Red.

Los resultados de concordancia obtenidos en los paneles se clasifican de la siguiente forma:

CONCORDANCIA (%)	CLASIFICACIÓN DE DESEMPEÑO
90.0 a 100%	Sobresaliente
80.0 a 89.99%	Satisfactorio
60-79.99	Mínimo
<60	Precario

Para aquellos que no obtengan desempeño sobresaliente deben realizar un análisis causa-raíz con base en los procedimientos establecidos en el LESP.

Realizar plan de atención a la causa –raíz identificada.

Enviar al Departamento de Bacteriología por correo electrónico la evidencia documental de lo anterior.

Dar seguimiento al plan establecido por cada LESP

Enviar al Departamento de Bacteriología las evidencias documentadas conforme a su plan de atención.

En caso de ser necesario, el Departamento de Bacteriología solicitará información adicional para verificar el análisis de las causas o el cumplimiento de las actividades planificadas por el LESP.

#### CRONOGRAMA PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Mes Actividad	enero	febrero	marzo	abril	mayo	junio	julio	agosto	septiembre	octubre	noviembre	diciembre
Envío de panel				x								
Envío de resultados del panel por parte de los LESP al InDRE					x							
Envío de Informe de PEED del InDRE a los LESP						x						
Supervisión a los LESP			x	x	x	x	x	x	x			
Análisis de muestras de control de calidad	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Envío de muestras para banco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Las fechas indicadas pueden cambiar, previo aviso.

# CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS

Para que un Laboratorio Estatal de Salud Pública se integre a la RNLSP-lepto, se requiere:

- Contar con la infraestructura, equipos, reactivos e insumos indicados por el LNR.
- Contar con personal capacitado por el InDRE.
- Una vez que el laboratorio cumpla con los requisitos antes mencionados se debe notificar al InDRE para que se inicie una inter comparación de resultados y se envíe un panel de evaluación, en esta etapa aún no puede emitir los resultados obtenidos al sistema de vigilancia epidemiológica.
- En caso de que su desempeño en el panel de inicio sea menor al 80%, el LESP deberá realizar un análisis causa-raíz con base en sus procedimientos establecidos y enviar al InDRE junto con su plan de atención, dar seguimiento, enviar periódicamente al InDRE la evidencia de dicho seguimiento. Si el desempeño es mayor o igual al 80% se autorizará el inicio del diagnóstico y emisión de resultados, lo que va ligado al envío inmediato por parte del LESP al InDRE del porcentaje de muestras establecidas para control de calidad y banco que le serán solicitadas vía oficio.
- En caso de que el desempeño sea sobresaliente (en control de calidad y paneles de evaluación) durante tres años consecutivos, se liberará el diagnóstico al laboratorio correspondiente y se solicitarán muestras para referencia.

## BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Aquellos que realicen el diagnóstico de Leptospirosis, están obligados a enviar el 100 % de muestras positivas al InDRE para su resguardo. A su vez en el InDRE mantiene un banco de todas las muestras positivas y 10% de negativas de las recibidas para diagnóstico.

El objetivo de mantener un banco de muestras es contar con de controles secundarios que pueden ser utilizados para el diagnóstico o evaluación, validación y verificación de los métodos diagnósticos utilizados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adler B, de la Peña A. Leptospira and Leptospirosis. Vet. Microbiol. 2009; 140(2010):287-296.
2. Brandao AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV, Abrao RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(11): 3138-3142.
3. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Atlanta, EU: Centers for Disease Control and Prevention; 01 Julio 2011 [actualizado 01 Julio 2011; acceso febrero 2013].Capítulo 3 enfermedades infecciosas relacionadas con viajes - Leptospirosis [3 pantallas]. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/Leptospirosis.htm>.
4. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
5. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
6. Goris MGA, Leeflang MMG, Boer KR, Goeijenbier M, van Gorp ECM, Wagenaar JFP, et.al. Establishment of valid laboratory case definition for human Leptospirosis. J Bacteriol Parasit 2012; 3(2): 1-8.
7. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. MMWR. Supplement/Vol. 60; 2011.
8. Instituto de Salud Carlos III [Internet]. España: Gobierno de España; fecha de publicación no disponible [fecha de actualización no disponible; acceso febrero 2013]. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España. Protocolo de las Enfermedades de Declaración Obligatoria [293 páginas]. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/protocolos-edo-revision-2000.pdf>
9. Levett PN. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2): 296-326.
10. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories, MMWR 6; 61:1-102; 2012. Disponible en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Miller%20MJ%22%5BAuthor%5D\" \"\\_blank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Miller%20MJ%22%5BAuthor%5D\)
11. Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la Leptospirosis en el humano.
12. OPS, OMS, ILS [Internet]. EUA; 2008 [fecha de actualización no disponible; acceso mayo 2017]. Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control [127 páginas]. [http://new.paho.org/per/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=334&Itemid=](http://new.paho.org/per/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=334&Itemid=)
13. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Perú: Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud Perú;

fecha de publicación no disponible [fecha de actualización no disponible; acceso febrero 2013]. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control [127 páginas]

14. Picardeu M. Diagnosis and epidemiology of Leptospirosis. Med. Mal. Infect. 2013. 43(1):1-9.
15. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Through Taqman polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009. 64(3): 247-255.
16. Smythe LD, Wuthiekanum V, Chierakuk W, Suttamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, et al Short report: the microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. Am. J. Trop Med Hyg 2009; 81(4):695-697.
17. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
18. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.

## ANEXOS

### Anexo I: Bioseguridad

El diagnóstico de Leptospirosis descrito en el algoritmo se debe de trabajar en un laboratorio BSL2, sin corrientes de aire, ordenado y libre de polvo. El personal debe portar en todo momento el equipo de protección personal como lo es guantes de látex o nitrilo, lentes de seguridad, bata blanca de

laboratorio, zapato de seguridad, así como ejercer buenas prácticas de laboratorio.

Las muestras biológicas deben ser manipuladas antes de su dilución o inactivación en cabinas de bioseguridad clase II. Realizar la clasificación y manejo de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) de acuerdo a la normativa vigente aplicable en México.

## Anexo II: Técnicas diagnósticas

### Técnica de MAT

#### Equipo

- ✓ Agitador semiautomático
- ✓ Baño María ( $56 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- ✓ Gabinete de bioseguridad clase II tipo A2
- ✓ Incubadora ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- ✓ Micropipeta para toma de 1000 microlitros
- ✓ Micropipeta para toma de 100 microlitros
- ✓ Micropipeta para toma de 50 microlitros
- ✓ Micropipeta para toma de 10 microlitros
- ✓ Micropipeta para toma de 6 microlitros
- ✓ Microscopio binocular, con condensador de campo oscuro
- ✓ Refrigerador ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ )

#### Materiales

- ✓ Contenedores para descontaminación de material
- ✓ Cubreobjetos de 22x22mm
- ✓ Detergente para lavado de material, neutro y libre de trazas
- ✓ Escobillones
- ✓ Gasa
- ✓ Gradilla para tubos de 13 X100 mm y 12x75mm (que no sean de unicel)
- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Jabón líquido desinfectante de manos



- ✓ Jeringas de plástico de 5mL y 10mL estériles
- ✓ Microplacas de polipropileno 96 pozos sin alta adherencia fondo plano
- ✓ Papel parafinado (parafilm)
- ✓ Pipetas serológicas terminales graduadas de 1mL y estériles
- ✓ Pipetas serológicas terminales graduadas de 2mL estériles
- ✓ Pipetas serológicas terminales graduadas de 5mL estériles
- ✓ Pipetor automático o perilla
- ✓ Pissetas
- ✓ Portaobjetos de 25x75mm
- ✓ Puntas para micropipeta
- ✓ Tubo para cultivo con tapón de rosca de 13x100mm
- ✓ Tubos de ensaye de 13x100mm y 12x75mm
- ✓ Tubos de polipropileno de 15 mL
- ✓ Unidades de filtración tipo perinola de 0.22 y 0.45 micras

## Biológicos

- ✓ Serovares viables de *Leptospira sp*, Tabla 2.

Tabla 2. Listado de Serovares pertenecientes al cepario el InDRE.

Género	Especie	Serovar	Cepa	Clave
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Australis	Ballico	1
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	2
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Copenhageni	M20	3
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A	4
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem	5
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Sejroe	M84	6
<i>Leptospira</i>	<i>Interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA	7
<i>Leptospira</i>	<i>kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C	8
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pomona	Pomona	9
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelitsin	10

<i>Leptospira</i>	<i>kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	11
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Wolffi	3705	12
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Bataviae	Swart	13
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV	14
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	15
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Castellonis	Castellón 3	16
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46	17
<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>	Panama	CZ 214	18
<i>Leptospira</i>	<i>biflexa</i>	Patoc	Patoc 1	19
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Bratislava	Jez-Bratislava	20
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Ballum	Mus 127	21
<i>Leptospira</i>	<i>santarosai</i>	Georgia	LT 117	22
<i>Leptospira</i>	<i>santarosai</i>	Borincana	HS 622	23
<i>Leptospira</i>	<i>weilii</i>	Celledoni	Celledoni	24
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	25
<i>Leptospira</i>	<i>santarosai</i>	Alexi	HS616	26
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Mankarso	Mankarso	27

\* El serovar 19 es saprófito

- ✓ Sueros controles positivos para cada una de las serovares utilizados
- ✓ Suero control negativo

## Reactivos

- ✓ PBS pH 7.5-7.6
- ✓ Medio basal EMJH para Leptospiras
- ✓ Enriquecimiento para medio base EMJH para Leptospiras

(ver preparación en anexos)

### Soluciones desinfectantes

- Hipoclorito de sodio al 1 %
- Etanol al 70%

### Registro de la muestra

Se verifica que cumpla con los criterios de aceptación correspondientes, se asigna a la muestra un número consecutivo interno y se registran los datos de la misma en bitácora.

### Preparación de la muestra

Realizar una dilución 1:40 del suero: (3.9 mL de PBS + 0.1mL del suero), en un tubo de ensaye limpio, previamente rotulado con el número de registro de la muestra a analizar y la fecha de realización.

Se agita e incuba la dilución en baño de agua por 30 minutos a  $56\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### Preparación de los serovares

Los cultivos de los serovares de *Leptospira* sp utilizados como antígeno en la prueba de MAT, son conservados y mantenidos en medio EMJH líquido a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  protegidos de la luz (el pase debe hacerse una vez por semana), estos deben estar viables y libres de contaminación, en fase de crecimiento de cultivo joven (4 a 10 días). Para su utilización en la prueba de MAT se hace una dilución con PBS a cada uno de los serovares, manejando siempre los cultivos en condiciones de esterilidad, hasta ajustarlas de 100-150 células por campo o bien de 25, 30 o 35 células por cuadrante procurando apegarse al valor inferior que es de 100 células por campo, la concentración se verifica colocando una gota (10µl) del cultivo entre porta y cubreobjetos y observándola en el

microscopio de campo oscuro con el objetivo de 40x. Antes de realizar la dilución se revisa la concentración de los cultivos en el microscopio de campo oscuro con el objetivo de 40X y tomando como referencia esta observación se calcula el volumen de PBS que se adicionará hasta obtener la concentración requerida (100 a 150 células por campo), se puede optar por la proporción 1:1 cuando no se tiene mucha experiencia, por ejemplo si se requiere un volumen de dilución de serovar final o total de 1.0ml se sugiere extraer 0.5ml de serovar + 0.5ml de PBS, agitar y de aquí tomar los 10µl para su observación, posteriormente si se observan muy concentrados se puede ir agregando 0.1ml de PBS e ir observando simultáneamente antes de agregar más PBS hasta llegar a la concentración deseada; en caso de que el cultivo tenga baja concentración se adicione inmediatamente el serovar, sin embargo cabe mencionar que es mejor agregar PBS que manipular continuamente los serovares. Entre más días de crecimiento tengan los cultivos se necesitará menos volumen de estos y más de PBS. Es muy importante agitar vigorosamente entre cada adición de PBS o serovar para homogenizar y deshacer autoaglutinaciones de los cultivos y realizar observaciones al microscopio entre cada adición de PBS y agitación.

El volumen de serovar diluido que se prepara se calcula de acuerdo al número de muestras problema, controles y diluciones que se van a realizar al día; más un excedente, tomando en cuenta que a cada reacción de microaglutinación se le adicionan 50µL de dicho serovar.

## Preparación de las placas

### Prueba tamiz:

Se rotulan con número consecutivo las placas que se utilizan un mismo día, esto de acuerdo al número de muestras por analizar.

Se anotan en un formato las muestras que se incluyen en la prueba de tamiz y el orden en el que se colocan en las placas.

Se adiciona a las placas de poliestireno de 96 pozos lo siguiente:

Primera fila (A): 50 µL de solución PBS en cada pozo.

Segunda fila (B): 50 µL del suero control negativo en cada pozo.

Tercera fila (C): 50 µL del suero control positivo en cada pozo respectivo a su serovar.

El resto de las filas (D-H): 50 µL de la muestra del suero a analizar (una alícuota para cada uno de los serovares a probar), la muestra de suero se coloca de manera horizontal en la placa.

Finalmente se adicionan en cada pozo 50 µL del serovar correspondiente por columna. Los serovares se colocan de manera vertical, siendo siempre la columna 1 la que contendrá al serovar 1 y así consecutivamente.

Si se analizan más muestras en un mismo día ya no es necesario incluir otra placa con controles, simplemente se adicionan en las placas consecutivas las muestras y el serovar.

Se agitan los serovares diluidos antes de colocarlos en los pozos.

Usar una punta limpia para cada muestra y para cada serovar.

Apilar las placas, cubrirlas de la luz e incubar a  $30\pm1^{\circ}\text{C}$  durante 90min.

Una vez pasado el tiempo, se realizan las lecturas de microaglutinación en microscopio de campo oscuro con el objetivo de 10x, sin usar cubreobjetos, si la cantidad de aglutinaciones es mayor o igual 2+ en algún serovar, entonces esa muestra se debe titular (únicamente se titula con el o los serovares con los

que presentó la aglutinación mencionada), de lo contrario el resultado de tamiz para ese serovar será negativo.

### **Titulación:**

Se rotulan las placas con número consecutivo del día, el número de placas depende del número de muestras que se sometan a la prueba de titulación.

Si se realiza prueba tamiz ese mismo día, no es necesario que se incluyan más testigos, de no ser así, entonces deberán incluirse los tres testigos previamente mencionados.

Las muestras a analizar y sus respectivas diluciones se anotan en bitácora, sólo se realiza titulación a aquellas muestras que en el tamiz presentaron aglutinaciones iguales o mayores a 2+, dichas muestras de manera inicial se llevan a 4 diluciones (1:80, 1:160, 1:320, 1:640) y se colocan en pozos consecutivos de la placa de manera vertical.

Se colocan 100 µL de la muestra a analizar en el primer pozo, y así consecutivamente el resto de las muestras en sentido horizontal.

Se adicionan 50 µL de PBS en los siguientes tres pozos en sentido vertical de donde se colocaron las muestras, posteriormente se realizan diluciones seriadas de manera vertical tomando 50 µL de la muestra colocada en el primer pozo y se vacían en el siguiente pozo que contiene PBS, se agita 10 veces con una micropipeta, después se toman 50 µL y se repite la operación en el siguiente pozo y de nuevo en el último pozo con PBS, de ahí, después de agitar, se toman 50 µL y se desechan, en total por cada muestra se ocupan 4 pozos, el primero solo con la muestra y los otros tres con muestra y PBS (que corresponden a las diluciones).

Cada pozo queda con un volumen total de 50 µL, posteriormente a cada dilución se le adiciona 50 µL del serovar al que haya sido positivo en el tamiz.

Se usa una punta limpia para cada dilución y para cada serovar.

Se apilan las placas, se cubren de la luz y se incuban a  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 90min. Una vez transcurrido el tiempo, se realizan las lecturas en microscopio de campo oscuro con el objetivo de 10x, sin usar cubreobjetos, el título de corte será la última dilución donde la cantidad de aglutinaciones sea mayor o igual a 2+ (siempre que la siguiente dilución tenga una lectura de 1+ ó 0), si en la mayor dilución (1:640) se obtiene una lectura  $\geq 2+$  aglutinaciones, entonces se deben realizar diluciones mayores, pues no hay manera de asegurar que a diluciones más grandes ya no haya aglutinación, por lo tanto en estos casos se procede a realizar una segunda serie de diluciones (1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240), el proceso es exactamente igual al anteriormente descrito, si en la última dilución (1:10240) se obtiene una  $\geq 2+$  aglutinaciones, entonces se deben realizar diluciones mayores, pues de igual manera no se puede asegurar que a diluciones más altas ya no haya aglutinación, en este caso se procede a realizar una tercera serie de diluciones (1:20480, 1:40960, 1:81920, 1:163840, 1:327680, 1:655360, 1:1310720 y 1:2621440), cabe aclarar que tanto las dobles y triples diluciones comenzaran nuevamente desde la primera dilución (1:80).

### **Lectura de la reacción de microaglutinación**

Se agita la reacción de cada pozo con una micropipeta, se toma una gota (6µl), se coloca en un portaobjetos y se observa con el objetivo 10X sin utilizar cubreobjetos, se realiza este procedimiento para cada pozo, para agilizar la lectura se pueden colocar varias reacciones a la vez en el mismo portaobjetos, esto de acuerdo a la habilidad del analista.

La lectura de aglutinaciones en cada pozo se realiza con base en los siguientes criterios:

	Lectura en cruces	Equivalente aglutinaciones con cruces
Es	++++ (4+)	75% a 100% de células aglutinadas ó 0% a 25% de células libres.
	+++ (3+)	50% a 75% de células aglutinadas ó 25% a 50% de células libres.
	++ (2+)	25% a 50% de células aglutinadas ó 50% a 75% de células libres.
	+ (1+)	1% a 25% de células aglutinadas ó 75% a 99% de células libres.
	- 0	Negativo, sin aglutinación ó 100% de células libres

requerimiento indispensable trabajar en las mismas condiciones una segunda muestra con un intervalo mayor o igual a 15 días y menor de 90 días naturales después de la fecha de toma de la primera muestra, en caso que el título encontrado en primera muestra sea menor a 1:1280.

### Interferencias

- ✓ Muestras contaminadas, hemilizadas o lipémicas
- ✓ Autoaglutinacion de serovares
- ✓ Solución diluyente y medios de cultivo contaminados
- ✓ Cultivos viejos de serovares (más de dos semanas)

### Interpretación por el laboratorio

#### a) Positivo

- ✓ Cuando en una segunda muestra se obtiene un aumento mayor o igual a 4 veces el título de la primera muestra respecto al mismo serovar.



- ✓ Cuando en una primera o única muestra se encuentran títulos  $\geq 1:1280$  para cualquier serovar.
- ✓ La aparición de cualquier serovar en segunda muestra con título  $\geq 1:320$  y que no estuvo presente en la primera muestra.

b) Negativo

- ✓ Cuando en una segunda muestra no se obtiene un aumento mayor o igual a 4 veces el título de la primera muestra respecto al mismo serovar (no existe seroconversión).

c) Indeterminado

- ✓ Muestra única (o primera) con títulos  $<1:1280$  a cualquier serovar.

### Fuentes de variabilidad

1. Se mantiene los serovares incubando a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , temperaturas más bajas pueden causar auto aglutinaciones.
2. Los sueros se estabilizan a temperatura ambiente antes de usarlos en la técnica, así se evita que causen autoaglutinación de los serovares.
3. Se debe controlar la temperatura y tiempo de descomplementación.
4. Se deben agitar los serovares antes y durante el ajuste, así como al colocarlos en la placa para la reacción de MAT, para homogenizar la concentración.
- 5.- Se deben agitar los sueros al colocarlos en la placa de reacción, esto permite homogeneidad en la alícuota tomada.

## Anexo III: Preparación de reactivos

### Preparación de medio líquido EMJH

#### Material

- vaso de precipitados de 1000 mL
- probeta de 1000 mL
- charola para pesar
- espátula
- agitador magnético
- matraz de 2000 mL
- gasa
- algodón
- papel Kraft
- cinta testigo

#### Equipos

1. balanza analítica o semianalítica
2. potenciómetro
3. parrilla de agitación

#### Reactivos

- Medio basal EMJH para Leptospiras

Marca: Difco

Referencia: 279410

Presentación: Frasco de 500 g

pH:  $7.5 \pm 0.2$

- Medio de Enriquecimiento EMJH para Leptospira

Marca: Becton Dickinson.

Referencia: 279510

Presentación: Caja con 6 frascos con 100 mL de EMJH enriquecimiento

#### Procedimiento de preparación

- 1.- Pesar 2.3 g del medio basal EMJH y disolver en 500 mL de agua destilada, colocar en una parrilla con agitación constante hasta su completa disolución.
- 2.-Ajustar pH a  $7.5 \pm 0.2$  con hidróxido de sodio al 20% y/o ácido clorhídrico al 20%.
- 3.-Completar 900 mL con agua destilada (libre de pelusas u otra partícula), tapar y rotular con nombre del medio, fecha de preparación, laboratorio y responsable. Colocar cinta testigo.
- 4.-Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos.
- 5.-Agregar asépticamente en el gabinete de bioseguridad 100 mL de enriquecimiento EMJH para Leptospiras (previamente descomplementado 30 min a  $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) al medio ya estéril, a temperatura ambiente.
- 6.-Mezclar bien y dosificar 5 mL en tubos estériles de 16 x 150 mm de tapón de rosca.

#### Prueba de esterilidad de medio EMJH

- 1.- Incubar a  $37 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$  durante 120 horas o 5 días.
- 2.- Primeramente observar la presencia o ausencia de turbiedad en todos los tubos de la gradilla.
- 2.- Realizar un muestreo aleatorio de 3 a 5 tubos por gradilla de 72 tubos.
- 3.- En condiciones asépticas tomar una alícuota de cada tubo y colocarla entre porta y cubre.
- 4.-Observar al microscopio con el objetivo de 40X.
- 5.-Un resultado satisfactorio para la prueba de esterilidad es ausencia de turbiedad, el medio debe presentar una coloración amarillo paja y cristalina, además en la prueba de gota observada al microscopio este deberá observarse limpio y libre de cualquier contaminación bacteriana.

#### Promoción de crecimiento de medio EMJH

- 1.-El medio de cultivo una vez preparado, deberá incluir controles de crecimiento.
- 2.-Una vez preparado el medio EMJH en condiciones asépticas se deberá inocular 0.5 mL de cada uno de los cultivos puros de leptospiras que se trabajan, e incubar a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 4 días y revisar al microscopio con el

objetivo de 40X, para ser una prueba satisfactoria se deberá observar una concentración considerablemente abundante de bacterias por campo.

3.-Adicionalmente se deberá incluir un control de medio sin inocular.

#### Almacenamiento

El medio de cultivo una vez aprobado se deberá almacenar en refrigeración a  $4 \pm 2$  °C y protegido de la luz, así como identificar con nombre del medio, fecha de preparación, lote, fecha de caducidad, número de gradilla y nombre del analista que preparó.

#### Preparación de solución de Sorensen

##### Materiales

- matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- probeta de 1000 mL
- espátula
- charola de pesaje
- agitador magnético
- barra magnética

##### Equipos

- potenciómetro
- balanza analítica

##### Reactivos

- Fosfato de sodio dibásico anhidro en cristales
- Fosfato de potasio monobásico anhidro cristales

##### Procedimiento de preparación

1.-Pesar de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.33 g + 1.09 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolver en 1000 mL de agua destilada en un agitador magnético.

2.-Ajustar el pH a  $7.5 \pm 0.2$

3.-Esterilizar a 121 °C por 20min/15 lb.

4.-Si es necesario filtre la solución a través de 0.22  $\mu$  de esta manera la solución se mantiene estable, generalmente esto es necesario después de transcurrida una semana de la fecha de preparación ya que suele presentar partículas.

#### Preparación de solución de Cloruro de Sodio o Solución Salina al 0.85%

##### Material

- matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- espátula
- charola de pesaje
- probeta de 1000 mL
- agitador magnético
- barra magnética
- filtros de 0.22  $\mu$

##### Equipos

- Balanza semianalítica o analítica

##### Reactivos

- Cloruro de sodio anhidro NaCl

##### Procedimiento de preparación

1.-Pesar 8.5 g de NaCl y se disuelven en 1000 mL de agua destilada usando un agitador magnético.

2.-Esterilizar a 121 °C por 20 min a 15 Libras de presión.

3.-Filtrar mediante membrana de 0.22  $\mu$

#### Preparación de PBS

##### Materiales

- probeta de 100 mL estéril
- guantes

## Equipos

- gabinete de bioseguridad

## Reactivos

- Solución de Sorensen
- Solución salina al 0.85%

## Procedimiento de preparación

- Mezclar 460 mL de solución salina al 0.85% + 40 mL de solución de Sorensen y homogeneizar. Realizar la mezcla en el interior del gabinete de bioseguridad, para conservar la esterilidad de la solución.
- Conservar a temperatura ambiente.

## Anexo IV: Técnicas de extracción de ácidos nucleicos y PCR tiempo real

### Áreas de trabajo y equipo mínimo necesario para trabajar

#### 1) Área de extracción

- o micro pipetas de volumen variable con capacidad de 20 a 200  $\mu$ L y 100 a 1000  $\mu$ L
- o gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A2
- o refrigerador
- o congelador
- o micro centrífuga
- o termoblock
- o agitador tipo vórtex

#### 2) Área de preparación de la mezcla de reacción

- o micro pipetas de volumen variable con capacidad de 0.5-10  $\mu$ L, 1-10  $\mu$ L, 20 a 200  $\mu$ l y 100 a 1000  $\mu$ l
- o gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A2
- o refrigerador
- o congelador
- o micro centrífuga

- agitador tipo vórtex

### 3) Área de adición de templados o DNA

- micro pipetas de volumen variable con capacidad de 0.5-10 $\mu$ L, 1-10 $\mu$ L
- gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A2 o Cabinas para PCR
- refrigerador
- congelador
- agitador tipo vórtex

### 4) Área de Instrumentos

- Termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System o Termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
- Centrífuga para placas

### Materiales

- aplicadores de madera
- arena estéril
- batas desechables
- bolsas de polipropileno
- contenedores para desecho de puntas, líquidos y punzocortantes.
- gasas
- gradillas para tubos eppendorf y tubos cónicos
- guantes desechables de nitrilo
- mango y hojas de bisturí
- marcadores indelebles
- mortero y pistilo
- pinzas
- placas de polipropileno con 96 pozos especiales para PCR en tiempo real
- puntas con filtro estériles para micropipeta de 0.5 a 10  $\mu$ L, 10 a 100  $\mu$ L, 20 a 200  $\mu$ L y 100 a 1000  $\mu$ L
- racks refrigerados

- tiras con 8 tapas ópticas ultra claras para tubos de PCR en tiempo real
- tiras con 8 tubos para PCR en tiempo real
- tubos cónicos de 50 ml
- tubos tipo eppendorf estériles de 0.5 y 1.5 mL

### Reactivos y materiales biológicos

- Agua grado PCR
- Buffer ATL catálogo 19076 o 939011
- DNA de *Leptospira interrogans* SER. icterohaemorrhagiae
- Estuche comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), QIAGEN catálogo 51106
- estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (250), QIAGEN catálogo 51306
- Etanol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Iniciador F-LipL32 AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG
- Iniciador R-LipL32 GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT
- Sonda P-L32 FAM-AAA GCC AGG ACA AGC GCC G-BHQ1
- RNaseP-F CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG
- RNaseP-R TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG
- RNaseP-P FAM-CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC-BHQ1
- Sonda CS-P 5-6-FAM-TGC AAT AGC AAG AAC CGT AGG CTG GATG-BHQ-1-3
- Taqman Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems catálogo 4369016

### Extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre completa

#### Consideraciones importantes

- Abrir una columna a la vez.
- Al centrifugar es recomendable dejar por lo menos un espacio entre cada tubo o muestra.



- Asegurarse que el buffer AW1 y AW2 fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Se requiere como equipo de protección personal bata exclusiva del área y guantes de nitrilo.
- Todos los pasos de centrifugación se pueden realizar a temperatura ambiente (15–25°C).
- Usar puntas con filtro y cambiar de punta entre la toma de cada reactivo.
- Centrifugar a máxima velocidad (14000 rpm) no afecta el rendimiento del DNA
- Después de dar vortex se recomienda centrifugar brevemente
- En cada proceso de extracción se anexa un testigo de la misma que está constituido de todos los reactivos utilizados más 200-400 µl de agua grado PCR (por cada 11 muestras un testigo).
- Incubar la columna con el Buffer de elución por 5 min a temperatura ambiente incrementa el rendimiento de DNA.
- La extracción se puede realizar de forma manual o automatizada en el robot QIAcube con su adecuado "Protocol Sheet".
- Para concentrar alguna muestra se recomienda eluir hasta en 50 µl de Buffer AE.
- Un tiempo largo de incubación a 56°C no afecta el rendimiento o calidad del DNA.
- Volúmenes pequeños de muestra se ajustan a 200 µl con agua grado PCR y se trabajan con la mitad de los reactivos que están indicados en los pasos 1, 2 y 4 los demás pasos no se modifican.

## **Acondicionamiento previo de las muestras**

### **Sangre total.**

Cuando la sangre no está hemolizada, se homogeniza suavemente para tomar la cantidad de muestra a trabajar, 400 µl.

Metodología de extracción (para 400 µl de muestra)

1. Adicionar 40 µl de proteasa o proteinasa K a un tubo de 1.5 ml, posteriormente adicionar los 400 µl de muestra.
2. Agregar 400 µl de Buffer AL y homogenizar con agitador tipo vortex.
3. Incubar 10 min a 56°C.
4. Adicionar 400 µl de etanol y homogenizar con agitador tipo vortex.
5. Transferir la mezcla a una columna y centrifugar a 14000 rpm / 1 min. Descartar el filtrado y transferir la columna a otro tubo colector. (Repetir este paso 2 veces para pasar todo el volumen).
6. Adicionar 500 µl de Buffer AW1, dejar reposar 1 min y centrifugar a 8000 rpm / 1 min, descartar filtrado y cambiar de tubo colector.
7. Adicionar 500 µl de Buffer AW2, dejar reposar 1 min y centrifugar a 14000 rpm / 3 min descartar filtrado y cambiar de tubo colector.
8. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm / 1 min.
9. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y adicionar 50 µl de Buffer AE:
10. Incubar por 5 min a t. ambiente. (15-25 °C) y posteriormente centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
11. Adicionar nuevamente 50 µl de Buffer AE
12. Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
13. Conservar el DNA eluído a 4°+/- 2°C C ó -20+/- 3°C °C hasta su uso.

NOTA. Todos los desechos biológico-infecciosos producidos en la extracción se desechan de acuerdo al manejo RPBI, los líquidos se colectan en un frasco para su posterior manejo CRIT.

### Extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de tejidos

Con los estuches de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit o QIAamp DNA Mini Kit y el buffer ATL de QIAGEN.

#### Consideraciones importantes

- Si el Buffer ATL tiene un precipitado blanco este se disuelve con calor (56°C).
- Si el órgano está sumergido en formol se trabaja por histología.

### Acondicionamiento de la muestra

-Se trabaja una biopsia sumergida en solución salina dentro de un envase de plástico de boca ancha, Figura 5.



Fig. 3 Envío correcto de biopsias.

- Si el contenido del envase se derramó, abrir dentro de un gabinete de seguridad, descontaminar el interior del contenedor y los envases con hipoclorito de sodio al 1%. Desechar el contenedor y el material usado como RPBI.

### Manejo del órgano o biopsia

-Cortar solo 50 mg (aproximadamente) del tejido con un bisturí, apoyándose en una caja petri, 50 mg ocupan la mitad de la marca de 0.1 en el tubo, como se muestra en la Figura 6.



Figura 4. Tamaño de biopsia que debe tomarse para la reacción de PCR.

#### Disgregación o maceración del tejido

-El fragmento de órgano se disgrega directamente presionando este en el fondo y paredes del tubo de 1.5 ml con ayuda de un aplicador grueso de madera, arena estériles y 100 microlitros del medio de transporte o agua grado PCR, Figura 7.



Figura 5. Maceración de tejido en tubo.

Otras opciones para disgregar el tejido son cortar con bisturí y utilizar mortero y unos granos de arena estéril, Figura 8.



Figura 6. Maceración de tejido en mortero.

#### Descontaminación y limpieza del material usado

Inmediatamente después del uso, coloque el instrumental y los demás elementos en solución de hipoclorito de sodio al 1 % 10 minutos a 1 hora, Figura 9. Posterior a la descontaminación todos los instrumentos se lavan perfectamente con agua y detergente para eliminar todo el material orgánico. Los instrumentos deben limpiarse cuanto antes después de su uso, para que ningún material orgánico se deshidrate y se adhiera.

Hojas de bisturí y material usado no reusable (gasas) se manejan y desechan como RPBI inmediatamente.

El órgano o biopsia se desecha como residuo patológico.



Figura 7. Descontaminación de instrumental.

#### Metodología

1. Disgregar 50 mg del tejido directamente en un tubo de 1.5 ml con unos granos de arena estéril y 100  $\mu$ l de la solución de transporte o agua estéril.
2. Adicionar 200  $\mu$ l de Buffer ATL, más 20  $\mu$ l de proteinasa K y dar vortex.
3. Incubar a 56 °C de 1-2 h, si es posible dar vortex ocasionalmente.
4. Adicionar 200  $\mu$ l de Buffer AL y dar vortex suficiente hasta tener una suspensión homogénea, posteriormente incubar 15 min a 70°C.
5. Centrifugar a 14000 rpm/30seg para separar el tejido no digerido, pasar todo el sobrenadante a un tubo limpio y descartar el sedimento.
6. Adicionar 200  $\mu$ l de etanol y dar vortex hasta homogenizar.
7. Transferir la mezcla a la columna y centrifugar a 8000 rpm/1 min, si no pasa todo el volumen aumentar la velocidad. Descartar el filtrado y transferir la columna a otro tubo colector.
8. Adicionar 500  $\mu$ l de Buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm / 1 min, descartar filtrado y transferir la columna a otro tubo colector.
9. Adicionar 500  $\mu$ l de Buffer AW2 y centrifugar a 14000 rpm / 3 min, descartar filtrado y

transferir la columna a otro tubo colector.

10. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm /1 min, descartar el tubo colector.
11. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y adicionar 50 µl de Buffer AE e incubar por 5 min a t. ambiente, al término centrifugar a 8000 rpm /1 min.
12. Adicionar nuevamente 50 µl de Buffer AE y centrifugar a 8000 rpm /1 min.
13. Conservar el DNA eluído a 4°C ó -20 °C hasta su uso.

### Condiciones de almacenamiento de reactivos

- Taqman Gene Expression Master Mix, Appiled Biosystems en refrigeración de 2 a 8 °C.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse en refrigeración de 2 a 8 °C. Una vez hidratados almacenarse a -20°C o menos en pequeñas alícuotas.
- Si el uso es continuo pueden mantenerse las alícuotas de trabajo en refrigeración (2-8°C).

### Fuentes de variabilidad

- Heparina como anticoagulante de las muestras de sangre
- Volumen de sangre insuficiente

### Mezcla para PCR para gen *LipL32* de género - *Leptospira spp.*

Preparar en un tubo la mezcla y posteriormente adicionar 20 µl de ésta a su respectivo tubo o pozo, Tabla 3.

Tabla 3. Cálculos para mezcla de reacción para gen LipL32

Reactivo

Taqman Gene Expression Master Mix

Marca: Applied Biosystems

REACTIVO	Vol. por	X $\frac{\text{No.}}{\text{Muestras}}$	Vol. Total (µl)
----------	-------------	--	-----------------------

	Reacción (μl)		
Gene Expression	12.5		
LipL32 F 10 pmol/μL	1		
LipL32 R 10 pmol/μL	1		
LipL32 P* 10 pmol/μL	1		
*H2O	4.5		

Vol. muestra: 5 μl\*

#### Mezcla para PCR para gen *RNAse P*

Preparar en un tubo la mezcla y posteriormente adicionar 20 μl de ésta a su respectivo tubo o pozo, tabla 4.

Se puede utilizar cualquier reacción de *RNAse P* que ya se tenga establecida en el laboratorio.

Tabla 4. Cálculos para mezcla de reacción para gen *RNAse P*

Reactivo

Marca: Applied Biosystems

REACTIVO	Vol. por Reacción (μl)	x <u>        </u> No. Muestras	Vol. Total (μl)
Gene Expression	12.5		
RNAse 3F 10 pmol/μL	1		
RNAse 3R 10 pmol/μL	1		
RNAse-P3 10 pmol/μL	0.5		
H2O	5		

5 μl

Vol. muestra:

#### Programa



50° C	95° C	95° C	58° C
2 min	10 min	15seg	1 min
45 ciclos			

Consideraciones de importancia:

- Al cargar los templados, usar una punta por cada muestra.
- Asegurarse que las tapas ópticas se encuentren perfectamente bien selladas.
- Mantener los ácidos nucleicos y reactivos de trabajo en red fría.
- Se debe utilizar bata de laboratorio exclusiva y guantes de nitrilo o libres de talco para cada una de las áreas.
- Todas las áreas de trabajo deben estar separadas entre sí y no se deben compartir los equipos y los materiales entre ellas.
- En los resultados indeterminados por PCR en tiempo real se debe repetir dicha reacción, con una extracción nueva de la muestra (si es que se cuenta con muestra suficiente).
- Los gráficos para *LipP32* deben ser de color azul y los gráficos para *RNAseP* de color verde.
- Si se cuenta con suficientes reactivos se puede trabajar las muestras por duplicado.
- Ajustar el umbral (threshold) con ayuda de los controles positivos y los NTC, al inicio de la fase exponencial temprana en la reacción lineal.

#### Interpretación por el laboratorio

**Positivo:** La presencia de una curva sigmoide bien definida donde se distingan claramente las tres fases de la reacción de PCR y presente un Ct menor o igual a 39 y amplificación de *RNAseP* positivo indica la presencia de DNA de *Leptospira spp.* en la muestra.

**Negativo:** sin amplificación del gen *LipL32* pero con amplificación de *RNAseP*.

**Indeterminado:** amplificación de *RNAsaP* y amplificación del gen *LipL32* con un Ct mayor a 39 que no pueden confirmarse con una repetición. Los resultados indeterminados sugieren la presencia de poco DNA.

**No adecuado:** aplica para muestras concesionadas (con volumen de sangre menor a 0.2 ml)

Control de calidad interno:

- control positivo gen *LipL32*: DNA proveniente de cultivo de *Leptospira interrogans*, diluido para que alcance un valor de Ct entre 20-25)
- -control positivo gen *RNasa P*: DNA proveniente de células humanas
- control NTC: agua
- -control de extracción: agua

Todas las muestras clínicas trabajadas deberán ser positivas a *RNasa P*, de no ser así repetir la reacción de PCR, si el resultado sigue negativo se debe repetir la extracción y si ninguna de las opciones anteriores cambia el resultado entonces la muestra no fue adecuada.



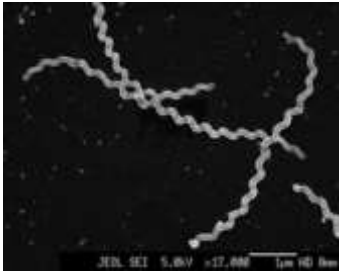
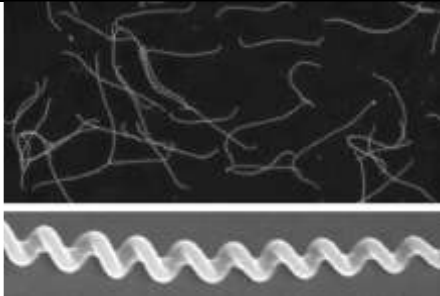
Control de calidad para LESP sin diagnóstico liberado:

- Deben enviar al menos 50 µl de DNA de cada una de las siguientes muestras en un micro tubo (o tubo tipo eppendorf) bien rotulado:
  - o Positivas el 100%,
  - o Indeterminadas el 100 %
  - o Negativas el 10%


Cada LESP debe enviar al InDRE, vía electrónica, el gráfico de cada una de las muestras enviadas, en escala lineal y logarítmica, mostrando el umbral en escala lineal e indicando claramente el valor de Ct obtenido y el nombre del paciente, así como una base mensual de los datos de las muestras recibidas para el diagnóstico.

#### Anexo IV: Imágenes de Portada

Imagen	Fuente
--------	--------

 <p>Imagen All.1</p>	<p>Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" Fotografía de la portada propiedad de HKS Arquitectos</p>
 <p>Imagen All.2</p>	<p>Adolph Weill. Médico alemán que describió la Leptospirosis como Ictericia Hemorrágica en Heidelberg entre trabajadores agrícolas alemanes en 1886.</p> <p><a href="https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/wp-content/uploads/sites/24/2011/10/eponomo-enfermedad-weil.pdf">https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/wp-content/uploads/sites/24/2011/10/eponomo-enfermedad-weil.pdf</a></p>
 <p>Imagen All.3</p>	<p>Micrografía electrónica de leptospira, un género de bacterias del orden Spirochaetales.</p> <p><a href="https://masscience.com/2015/10/04/Leptospirosis-una-enfermedad-olvidada/">https://masscience.com/2015/10/04/Leptospirosis-una-enfermedad-olvidada/</a></p>
 <p>Imagen All.4</p>	<p>Micrografía electrónica de leptospiras.</p> <p><a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X12003198">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X12003198</a></p>
	<p>Ciclo de transmisión de la Leptospirosis</p> <p><a href="http://www.medindia.net/patients/patientinfo/Leptospirosis.htm">http://www.medindia.net/patients/patientinfo/Leptospirosis.htm</a></p>

 <p>Imagen All.5</p>	
 <p>Imagen All.6</p>	<p><b>Ratón doméstico.</b> La infección de pequeños roedores (animales portadores) ocurre precozmente en la vida del animal, la elimina por orina a lo largo de toda su vida, lo que resulta en la contaminación del medio ambiente, especialmente el agua.</p> <p><a href="http://www.elrincondelamedicinainterna.com/2012/05/Leptospirosis.html">http://www.elrincondelamedicinainterna.com/2012/05/Leptospirosis.html</a></p>
 <p>Imagen All.7</p>	<p>La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de potencial epidémico, principalmente después de fuertes lluvias.</p> <p><a href="http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&amp;view=article&amp;id=7377%3A2012-Leptospirosis-informacion-detallada&amp;catid=4711%3ALeptospirosis-home&amp;Itemid=39617&amp;lang=es">http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&amp;view=article&amp;id=7377%3A2012-Leptospirosis-informacion-detallada&amp;catid=4711%3ALeptospirosis-home&amp;Itemid=39617&amp;lang=es</a></p>
	<p>Ictericia conjuntival, uno de los signos presentes en la Leptospirosis.</p> <p><a href="http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/Leptospirosis.htm">http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/Leptospirosis.htm</a></p>

 <p>Imagen All.8</p>	
 <p>Imagen All.10</p>	<p>Figura 3. Envío correcto de biopsias</p>
 <p>Imagen All.11</p>	<p>Logotipo del Programa de Zoonosis del CENAPRECE</p> <p><a href="http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/portada_zoonosis.html#">http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/portada_zoonosis.html#</a></p>
	<p>Microscopía electrónica de <i>L. interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae RGA</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292640">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292640</a></p>



1939 · 2019

**AÑOS**

*Siendo Referencia Nacional en Salud Pública*

**INDRE**

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud  
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
"Dr. Manuel Martínez Báez"