
	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 1 de 9</b>

## **ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA**


Elaborado por:	CNSP Blgo. Manuel Céspedes Zambrano
Revisado por:	CNSP TM. Julia I. Espinoza Soto CNSP MV Gladys Malásquez Mendoza
Aprobado por:	RD 014-2008-DG-CNSP/INS <span style="float: right;">Fecha:2008-09-18</span>

**EL PRESENTE DOCUMENTO SE DISTRIBUYE COMO COPIA NO CONTROLADA Y TIENE UNA VIGENCIA DE 2 AÑOS CONTADO A PARTIR DE LA FECHA DE SU APROBACIÓN.  
EL EQUIPO DE GESTION DE LA CALIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA PROCESA LAS PROPUESTAS DE MODIFICACIÓN Y ACTUALIZA LAS EDICIONES VIGENTES DEL MISMO**

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 2 de 9</b>

## INDICE

		Pág.
1.	OBJETIVOS	3
2.	CAMPO DE APLICACIÓN	3
3.	REFERENCIAS	3
4.	DEFINICIONES	3
5.	FUNDAMENTO DEL METODO	4
6.	DESARROLLO DEL METODO DE ENSAYO	4
	6.1 CONDICIONES PREVIAS	4
	6.2 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD	4
	6.3 TIPO DE MUESTRA	5
	6.4 PREPARACION DE LA MUESTRA	5
	6.5 EQUIPOS	5
	6.6 MATERIALES	5
	6.7 INSUMOS	5
	6.8 EJECUCIÓN DEL METODO	6
7.	CALCULO	6
8.	INTERPRETACION DE RESULTADOS	6
9.	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	7
10.	ANEXOS:	
	10.1 ANEXO A FORMULARIOS DE REGISTRO DE MUESTRAS	8
	10.2 ANEXO B PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	9

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 3 de 9</b>

## 1 OBJETIVO

Describir el procedimiento para la detección de anticuerpos IgM para leptospira por la prueba de ELISA, en muestras de suero humano.

## 2 CAMPO DE APLICACIÓN


Aplica para el Laboratorio de Zoonosis Bacteriana del Centro Nacional de Salud Pública del INS.

## 3 REFERENCIAS

- 3.1 Instituto Nacional de Salud - Manual de Procedimientos de Laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Serie de Normas Técnicas N° 15 –Segunda Edición –1997.
- 3.2 MAN-INS-001 Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos, Serie de Normas Técnicas N° 18, 3ª Edición, año 2005.
- 3.3 Instituto Nacional de Salud – Manual de Procedimientos Bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Serie de Normas Técnicas N° 34 – 2002.
- 3.4 Manual de Normas Técnicas de Laboratorio para la Obtención y envío de muestras. Serie de Normas Técnicas N° 18, 2da ed. 2002.
- 3.5 PRT-CNSP- 010: Emisión de Informes de Resultados

## 4 DEFINICIONES

- 4.1 **anticuerpo:** Los Anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas) son glucoproteínas del tipo gamma globulina que se encuentran en la sangre o en otros fluidos corporales de los vertebrados y son empleadas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus.
- 4.2 **antígeno:** Sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye parte en las bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas).
- 4.3 **serovar:** unidad taxonómica básica dentro de la clasificación de las leptospiras: ejemplo serovar Pomona (antes se escribía Leptospira pomona).
- 4.4 **fase “leptospiremica:** También conocida como Fase septicémica es cuando la bacteria leptospira esta circulando en sangre, generalmente es en la primera semana de enfermedad y se puede aislar mediante cultivo de una muestra de sangre anticoagulada.
- 4.5 **fase inmune:** los antígenos de la bacteria generan respuesta inmune y se producen anticuerpos que son detectable por las pruebas serológicas.
- 4.6 leptospirosis: enfermedad zoonotica de distribución mundial, más frecuente en el trópico donde las condiciones para su transmisión son particularmente favorables, es causada por espiroquetas patógenas del género Leptospira. La infección se realiza por contacto directo o indirecto con orina de animales infectados, suelos y fuentes de agua.

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 4 de 9</b>

- 4.7 **ELISA:** Prueba ensayo inmunoenzimático ligado a enzima que se usa para detectar antígenos o anticuerpos.
- 4.8 **registro:** Documento que provee evidencias objetiva de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.
- 4.9 **zoonosis:** Infección o enfermedad infecciosa transmisible, en condiciones naturales, de los animales vertebrados a los humanos. Puede ser enzoótica o epizoótica.
- 4.10 **MAT:** prueba de referencia serológica para el diagnóstico de leptospirosis humana y animal.

## 5 FUNDAMENTO DEL MÉTODO


El método de ELISA es usado como una prueba de tamizaje que se complementa con la prueba de MAT, es un método para detectar anticuerpos IgM producto de una infección por leptospira; los anticuerpos se combinan con el antígeno de leptospira fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. Luego el suero residual es removido por medio de lavados, y se añade el conjugado anti-humano IgM ligado a la enzima (peroxidasa), posterior a la incubación, los micropocillos son lavados y se añade el sustrato (peróxido de hidrógeno) más un cromógeno. El sustrato es hidrolizado por la enzima y el cromógeno varía de color, la reacción se detiene por la adición de una solución de parada. La intensidad de color está directamente relacionado con la concentración de anticuerpos contra leptospira presentes en la muestra de suero.

Los anticuerpos de IgM se presentan en una reciente infección y se pueden detectar específicamente por ELISA; se han desarrollado gran variedad de pruebas de ELISA que comparándolos con la prueba MAT muestran alta concordancia. Usando un antígeno o pool de antígenos en la prueba de ELISA se pueden determinar anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados; los sueros que salgan positivos deberán ser confirmados por MAT.

## 6 DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO

### 6.1 CONDICIONES PREVIAS

- 6.1.1 Verificar en la ficha clínico-epidemiológica del paciente la fecha de inicio de la enfermedad, toma de muestra y tiempo de la enfermedad.
- 6.1.2 Llenar los registros de los Anexos A y B, para ubicar la muestras y los controles
- 6.1.3 Para éste método se utilizará el kit de Elisa IgM elaborado y estandarizado en el INS.
- 6.1.4 El tipo de muestra mas adecuada es el suero, y la cantidad necesaria para la prueba es de 0,3 a 0.5 mL y no es necesario inactivarlos.
- 6.1.5 Durante la enfermedad se reconocen dos fases: la primera corresponde a la fase "leptospiémica" o "septicémica", que dura 4 a 7 días. Después de 1 a 3 días se inicia la fase "inmune", con diversos signos o se presenta como asintomática, durante esta fase las leptospiras pueden ser

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 5 de 9</b>

6.1.6 excretadas transitoriamente con la orina en los humanos, pero el hombre no constituye un reservorio.  
La toma de muestra se hará en la fase aguda ó leptospiremica 4 a 10 días de iniciado los síntomas y se debe tomar otra muestra en la fase convaleciente o inmune (7 a 30 días después de la primera muestra).

## 6.2 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

El personal involucrado en el proceso de diagnostico debe cumplir las normas de Bioseguridad establecidas en el Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos, Serie de Normas Técnicas N° 18, 3ª Edición, año 2005.

## 6.3 TIPO DE MUESTRA

Suero humano.

No se recomienda trabajar con sueros hemolizados por que pueden afectar a la prueba.

## 6.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Enviar las muestras al laboratorio en cadena de frío, mantener las muestras en refrigeración hasta su procesamiento por un tiempo máximo de una semana, si es que no van a ser procesadas de inmediato mantenerlas en congelación a temperatura de -20°C ó -70° C.

## 6.5 EQUIPOS

- Lector de microplacas
- Lavador de microplacas
- Estufa entre 35 -37°C
- Micropipetas rango graduable : 2-20µl, 10-100 µl y 100-1000µl
- Micropipeta multicanal 30-300 µl
- Reloj
- Potenciómetro
- Rotador ó Shaker


## 6.6 MATERIALES

- Tubo de microdilución de polipropileno de 1,1 ml
- Contenedor de material contaminado
- Tips para micropipetas

## 6.7 INSUMOS

Kit de ELISA IgM, elaborado y estandarizado en el INS, constituido por:

- Placa o tiras impregnadas con antígeno de leptospiras.
- Diluyente de suero
- Diluyente de conjugado
- Conjugado stock
- Sustrato
- Solución de parada
- Control positivo
- Control negativo

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 6 de 9</b>

- Calibradores de corte
- Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4
- Tween 20

## 6.8 EJECUCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

- 6.8.1 Mantener las muestras y los reactivos del kit a temperatura ambiente entre 10 a 15 minutos antes de realizar la prueba.
- 6.8.2 Usar un control positivo, un control negativo y dos calibradores de corte por triplicado
- 6.8.3 Diluir el control positivo, negativo, los dos calibradores de corte por triplicado y las muestras por duplicado 1:100 (5 µl) con el diluyente de suero (495µl) en tubos de dilución.
- 6.8.4 Agregar 100µl a cada pocillo de cada dilución de controles y muestras e incubar por 1 hora entre 35-37°C.
- 6.8.5 Lavar 6 veces con PBS y Tween 20 a 0.05% cada vez con 350- 400µl de buffer por pocillo, este procedimiento realizar en un lavador de microplacas o tiras.
- 6.8.6 Agregar 100 µl de conjugado anti-humano IgM (diluido 1/1000) en cada pocillo de la microplaca o tira e incubar por 30 minutos entre 35-37°C.
- 6.8.7 Lavar 6 veces con PBS y Tween 20 a 0.05% cada vez con 350-400µl de buffer por pocillo (usar un lavador de microplacas o tiras)
- 6.8.8 Secar la microplaca o microtira colocándola en posición boca abajo sobre papel absorbente, realizar pequeños golpes hasta secar completamente la microplaca o microtira.
- 6.8.9 Agregar 100 µl de sustrato ABTS a cada pocillo e incubar entre 35 a 37°C por 30 minutos.
- 6.8.10 Terminada la incubación agregar 100µl de solución de parada SDS a 1%.

## 7. CALCULO


$$(UL) = 10 \times \frac{D. Om}{X}$$

- UL = Unidades Lepto  
D.Om = Densidad óptica de la muestra  
X = Promedio de densidad óptica de calibradores de corte

## LECTURA

- Realizar la lectura en lector de Microplacas a 405 nm con filtro de referencia entre 620-630 nm.
- El control positivo presentara una coloración verde intenso
- El control negativo será transparente
- Los calibradores estarán ligeramente coloreados.
- La muestra positiva presentara coloración verde semejante al control positivo.

## 8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-007</b>
	<b>ELISA IgM PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIRA</b>	<b>Edición N° 01</b>
		<b>Página 7 de 9</b>

- 8.1 Luego de la lectura realizar el cálculo de la unidad Lepto para cada muestra mediante la fórmula (cálculo de unidades).
- 8.2 La muestra se considerará como positiva si las unidades Lepto obtenidas mediante este cálculo se encuentran mayor a 11, estas muestras deberán ser confirmadas por la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
- 8.3 La muestra se considerará negativa cuando las unidades Lepto obtenidas mediante el cálculo sea menor a 9.
- 8.4 Si en la muestra se detectan valores intermedios entre 9 y 11 unidades Lepto, se deberá realizar también la prueba de MAT. Asimismo se solicitará una segunda muestra después de una semana hasta un mes para ver el incremento de anticuerpos.
- 8.5 Un incremento del 50% en unidades Lepto en muestras pareadas es significativo, y se confirma el caso como Leptospirosis; a la vez este resultado deberá confirmarse por la prueba del MAT.
- 8.6 Cuando se presentan divergencias como falsos negativos (la cantidad de anticuerpos no es detectable por la prueba), es necesario una segunda muestra

<b>Unidades LEPTO</b>	<b>Resultados</b>	<b>Interpretación</b>
< 9	No reactivo/Negativo	No evidencia anticuerpos IgM contra Leptospira
9-11	Indeterminado	Sugiere segunda muestra
> 11	Reactivo/Reactivo	Presencia de anticuerpos IgM contra Leptospira

## 9. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados serán expresados en unidades Lepto.

La emisión de resultados será conforme lo establece el PRT-CNSP- 010

## 10. ANEXOS

Anexo A: Formularios Registro de muestras

Anexo B: Procesamiento de muestras

**ANEXO A**

**FORMULARIO REGISTRO DE MUESTRA**

FOR -001-MET-CNSP-007



**ELISA IgM PARA LEPTOSPIRA**

Edición N° 01

Pag.1


**LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA - ZONOSIS BACTERIANA**

Código del INS	Código del laboratorio	Nombres y apellidos	Procedencia	Oficio de referencia	Fecha de ingreso	Toma de Muestra	Cultivo	ELISA IgM	MAT	PCR	Fecha de resultado	Observaciones
Analista Responsable							Coordinador del Laboratorio					
Nombre y firma							Nombre y firma					

**EL PRESENTE DOCUMENTO SE DISTRIBUYE COMO COPIA NO CONTROLADA Y TIENE UNA VIGENCIA DE 2 AÑOS CONTADO A PARTIR DE LA FECHA DE SU APROBACIÓN.  
EL EQUIPO DE GESTION DE LA CALIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA PROCESA LAS PROPUESTAS DE MODIFICACIÓN Y ACTUALIZA LAS EDICIONES VIGENTES DEL MISMO**



## ANEXO B

	<b>FORMULARIO</b>								FOR-002- MET- CNSP-007			
	<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS ELISA IgM PARA LEPTOSPIRA</b>								Edición N° 01			
	<b>Pag. 1</b>											
<b>LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ZONOSIS BACTERIANA</b>												
Fecha de proceso												
Antígeno										N° Lote		
Lectura												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
<b>OBSERVACIONES</b>												
Analista Responsable						Coordinador del Laboratorio						
Nombre y firma						Nombre y firma						
Fecha						Fecha						

EL PRESENTE DOCUMENTO SE DISTRIBUYE COMO COPIA NO CONTROLADA Y TIENE UNA VIGENCIA DE 2 AÑOS CONTADO A PARTIR DE LA  
 FECHA DE SU APROBACIÓN.  
 EL EQUIPO DE GESTION DE LA CALIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA PROCESA LAS PROPUESTAS DE MODIFICACIÓN Y  
 ACTUALIZA LAS EDICIONES VIGENTES DEL MISMO