

## Estudio comparativo del diagnóstico de *leptospirosis* mediante PCR y MAT en el noroeste de México

### A comparative study of the diagnosis of *leptospirosis* by PCR and MAT in northwestern Mexico

**Recibido:** 3 de octubre del 2016  
**Aceptado:** 20 de marzo del 2018  
**Publicado:** 13 de septiembre del 2018

Edgar Sandoval Petris\*, Magali Avilés Acosta\*\*, Rosa Ma. Montesinos Cisneros\*\*\*, Maricela Montalvo Corral\*\*\*\*, Armando Tejada Mansir\*°

#### Cómo citar:

Sandoval-Petris, E., Avilés Acosta, M., Montesinos Cisneros, R. M., Montalvo Corral, M., Tejada Mansir, A. (2018). Estudio comparativo del diagnóstico de *leptospirosis* mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta Universitaria*, 28(4), 50-55. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2018.1625>

\* Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Correo electrónico: [atejada@guayacan.uson.mx](mailto:atejada@guayacan.uson.mx)  
\*\* Laboratorio de Biología Molecular, Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora.  
\*\*\* Departamento de Matemáticas, Universidad de Sonora.  
\*\*\*\* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.  
° Autor de correspondencia.

**Palabras Clave:**  
*Leptospirosis*; PCR; MAT.

**Keywords:**  
*Leptospirosis*; PCR; MAT.

## RESUMEN

Se empleó la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), comparada con la técnica serológica de referencia para la detección de *Leptospira* spp., para evaluar su aplicación como método de diagnóstico de *leptospirosis* en muestras de pacientes sintomáticos de reciente infección, atendidos por el sector salud del noroeste de México. Se analizaron muestras de 34 pacientes tanto por PCR como por la técnica de microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos mediante PCR mostraron completa concordancia con las determinaciones de pacientes positivos o indeterminados mediante MAT. De 31 muestras negativas o no confirmadas por MAT, 7 resultaron positivas mediante la prueba de PCR (20%). La técnica de PCR implementada en este estudio mostró ser una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad combinada con la prueba serológica MAT, destacando su ventaja en la detección temprana de la *leptospirosis*.

## ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR), compared to the serological reference technique for the detection of *Leptospira* spp., was implemented to evaluate its application as a *leptospirosis* diagnosis method in samples of symptomatic patients of recent infection from the health sector in northwestern México. Samples of 34 patients were analyzed using the PCR and the microagglutination test (MAT). The results obtained by the PCR showed complete concordance with the determinations of positive or indeterminate patients obtained by the MAT. Out of 31 negative samples or not confirmed by the MAT, 7 (20%) were positive by the PCR. The PCR technique implemented in this study showed to be a useful tool in the diagnosis of the *leptospirosis* combined with the serological test MAT, emphasizing its usefulness for early detection of this disease.

## INTRODUCCIÓN

La *leptospirosis* es un problema de salud pública tanto en países subdesarrollados como en países desarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, por sus siglas en inglés) cada año se presentan 14 nuevos casos por cada 100 000 habitantes de *leptospirosis* en el mundo (WHO, 2011). Sin embargo, se cree que la prevalencia de la enfermedad está subestimada (Hartskeerl, 2006). La incidencia promedio mundial de *leptospirosis* humana endémica es de 5 casos por cada 100 000 habitantes según la OMS, aclarando que existen zonas donde se alcanzaron hasta 975 casos por cada 100 000 habitantes. Para el caso de América la estimación es de 12.5 casos por cada 100 000 habitantes (WHO, 2011). La situación epidemiológica de *leptospirosis* en México en el 2010 presentaba una tasa nacional de 0.45 casos por cada 100 000 habitantes, y los estados que presentaron una incidencia mayor son: Hidalgo, Sinaloa, Veracruz, Tabasco, Yucatán y Sonora que oscilaban entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100 000 habitantes (Secretaría de Salud, 2012). Según los informes periódicos de la Secretaría de Salud (2017), el estado de Sonora presenta anualmente casos confirmados de enfermedades infecciosas como Dengue y Rickettsiosis, ambas con características clínicas muy similares a las que presenta la *leptospirosis* (García-Ruiz et al., 2016; Levett, 2001). Por tal motivo, a muchos de los pacientes que presentan síndrome febril se les realiza la prueba diagnóstica para estas tres enfermedades.

Existen varias pruebas de laboratorio que se utilizan para el diagnóstico de *leptospirosis* dentro de las que destacan: cultivo bacteriano, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), detección de IgM y por la Técnica de Microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés). Esta última, es considerada el estándar de oro del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica (serovar/serogrupo) en comparación con las otras pruebas disponibles actualmente (WHO, 2003). Sin embargo, en ocasiones puede mostrar resultados poco concluyentes debido a la dificultad de obtener segundas muestras serológicas del paciente que permitan observar la seroconversión cuando en la primera muestra se presentan resultados negativos o títulos bajos (De Abreu et al., 2006; Levett & Branch, 2002). Por otra parte, también se puede mencionar las restricciones de algunos laboratorios de disponer de un gran número de cepas de referencia de *Leptospira* spp., útiles para llevar a cabo la prueba.

Actualmente, es muy recomendable contar con métodos de diagnóstico de *leptospirosis* basados en las técnicas moleculares modernas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) puesto que ha resultado ser muy útil en la detección de diversos patógenos, presentando varias ventajas sobre las técnicas de

detección serológicas como mayor sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados (Branger et al., 2005; Kurlung et al., 2017; Riediger et al., 2017).

Algunos protocolos de diagnóstico de *leptospirosis* mediante PCR, se basan en la amplificación del gen LipL32 que codifica a una lipoproteína altamente conservada en la membrana externa de las especies patógenas de *leptospiras*, además es considerada importante en la patogénesis de la enfermedad (Kumaran et al., 2017; Vivian et al., 2009).

El uso rutinario de la PCR para el diagnóstico de *leptospirosis* podría ayudar a superar las limitaciones de la MAT mencionadas anteriormente y permitir la detección durante el periodo de días en el que la bacteria se encuentra en sangre (fase septicémica) e inclusive en orina. Muchos de los laboratorios oficiales que diagnostican *leptospirosis* en México, no cuentan con esta técnica molecular invaluable para el diagnóstico y tratamiento temprano en los casos sospechosos y positivos de *leptospirosis*.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la aplicación de la técnica de PCR y MAT para el diagnóstico de *leptospirosis* en sueros de pacientes sintomáticos referidos al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora (Lespson).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras analizadas

El estudio fue descriptivo, retrospectivo con muestreo no probabilístico, por conveniencia. Se emplearon  $n = 34$  muestras de suero de pacientes sintomáticos colectadas en centros de salud del estado de Sonora por personal de la Secretaría de Salud y referidas al Lespson, en el periodo de junio-diciembre del 2009. Dichas muestras se tomaron durante los primeros 7 días de iniciados los síntomas. Los pacientes cursaban con síndrome febril y otra signología característica de *leptospirosis* y/o presentaban previamente un resultado positivo mediante MAT. Las muestras empleadas en este estudio habían sido previamente procesadas por personal del Lespson para el diagnóstico serológico de *Leptospira*. En algunas muestras donde el diagnóstico presuntivo no era claro para *leptospirosis*, el Lespson las analizó para el diagnóstico de Dengue y Rickettsia. El tratamiento y manejo de las muestras se hizo en apego a estricta confidencialidad. No se tuvo acceso a los datos de identidad de las muestras, ni demográficos. La información obtenida se limitó a los datos clínicos de cuadro presuntivo por referencia epidemiológica y resultados de prueba MAT.

## Cepas de referencia

Se usaron 6 cepas patógenas *Leptospira* spp., de referencia nacional (serovariedades: canicola, icterohaemorrhagiae, pyrogenes, automnalis, cynopteri y hardjo) proporcionadas por el Lespson. Estas cepas se inocularon en tubos estériles con 5 ml de medio Ellinghausen y Mclough, modificado por Johnson y Harries (EMJH) (SIGMA) y se dejaron incubando a 29 °C durante 7 días o hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  leptospiras/mL (WHO, 2003).

## Análisis MAT

Las muestras de suero de los pacientes se analizaron (determinación realizada por personal de Lespson) mediante el método de referencia de MAT en la que se emplearon 6 serovares de *Leptospira* spp., como antígenos vivos, de acuerdo a lo recomendado por la WHO (2003). Se consideraron casos positivos de infección reciente de leptospirosis los sueros únicos con título de anticuerpos mayor o igual a una dilución 1:800. Las muestras de sueros únicos positivos con títulos menores a una dilución 1:800 se consideraron casos positivos indeterminados, mientras que el resto de los sueros se consideraron casos negativos o no confirmados mediante MAT.

## Análisis molecular por PCR

En este estudio se analizaron por PCR los ADN extraídos de las muestras de suero y de las cepas de *Leptospira* spp., usadas como control, utilizando el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN) bajo las instrucciones del fabricante. Las condiciones para el aislamiento de ADN genómico de las muestras clínicas y cepas de referencia, se hicieron en el Laboratorio de Agentes Patógenos del Lespson, en campaña de bioseguridad nivel 3 (BSL-3).

Para las amplificaciones de ADN se utilizaron los oligonucleótidos específicos para un fragmento del gen LipL32 (260 pb) y las condiciones de termociclado descritas por Branger *et al.*, (2005). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Cycloer™ (BIORAD). Se colocaron 40 µL de la mezcla de reactivos del kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), 5 µL (1 ng a 500 ng) del ADN purificado y 2.5 µL de cada iniciador (20 µM) (Hap1FDx 5-GCAAGCATTACCGCTTGTGG-3 y Hap1RDx 5-TGTTGGGGAAATCATACGAAC-3) a un volumen final de 50 µL. La mezcla de reactivos se incubó bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 15 s, 60 °C por 35 s, 72 °C por

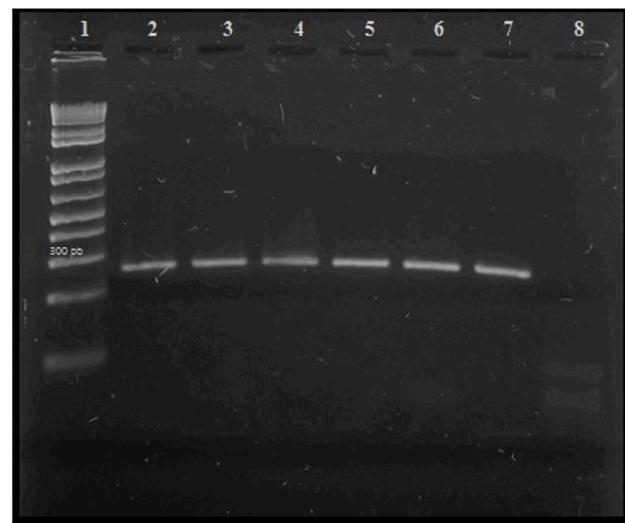
40 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un fotodocumentador de UV Gel Logic 100 System (KODAK).

## Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de los datos, se calcularon los porcentajes de muestras positivas y negativas para cada técnica, así como los datos de sensibilidad y especificidad.

## RESULTADOS

Se establecieron las condiciones experimentales de la técnica de PCR para la amplificación de un fragmento interno del gen LipL32 (260 pb) utilizando 6 cepas de referencia de *Leptospira*. La figura 1 muestra el perfil electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR de un fragmento interno del gen LipL32 de *Leptospira*, de los serovares: canicola, icterohemorrágica, pyrogenes, automnalis, cynopteri y hardjo respectivamente (260 pb). Los resultados muestran la obtención del amplicón de tamaño esperado, según lo descrito por Branger *et al.*, (2005).



**Figura 1**

Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de un fragmento interno del gen LipL32 de *Leptospira* spp. Línea 1 marcador de peso molecular; línea 2-7 serovares: canicola, icterohemorrágica, pyrogenes, automnalis, cynopteri y hardjo respectivamente (260pb); línea 8 control negativo (mezcla de reactivos para PCR más agua).

Fuente: Elaboración propia.

Se analizaron 34 sueros de pacientes con sospecha de leptospirosis mediante MAT y PCR, de los cuales se detectaron como positivos e indeterminados mediante MAT a 3 (9%) pacientes, mismos que resultaron positivos también por PCR. De los 31 pacientes con resultado negativo o no confirmado mediante MAT encontramos que 7 (20%) de esos pacientes presentaron un resultado positivo a la técnica de PCR (tabla 1), esto nos indica que la técnica de PCR es más sensible que la de MAT para el diagnóstico de la enfermedad en los primeros días de iniciados los síntomas. La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR fue de 100% y 77.4%, respectivamente. Adicionalmente, se encontró que 2 casos positivos por PCR presentaron co-infección con Dengue (MAT negativo) y Rickettsia (MAT indeterminado) (tabla 1).

En cuanto a los síntomas clínicos más frecuentes referidos por los pacientes confirmados o probables casos de leptospirosis podemos mencionar: fiebre (100%), dolor de cabeza (100%), dolor muscular (100%), artralgia (90%), diarrea o dolor abdominal (50%), entre otros. Un dato relevante que encontramos en este trabajo fue el hecho de encontrar un caso de defunción que presentó escape de líquidos, signo clínico no presente en el resto de los pacientes, que pudo haber agravado el estado de salud del paciente. Cabe mencionar que este caso de defunción tuvo un resultado positivo a leptospirosis mediante PCR y negativo al MAT (tabla 2).

## DISCUSIÓN

La leptospirosis es una enfermedad re-emergente de importancia en salud pública. Sin embargo, no se ha sistematizado y ampliado su vigilancia epidemiológica, y existen factores bioclimáticos que pueden favorecer su presencia en diferentes regiones, por lo que los datos de prevalencia en el país podrían estar subestimados (Sánchez-Montes, Espinoza-Martínez, Ríos-Muñoz, Bersunza-Cruz & Becker, 2015). El éxito del control epidemiológico de la leptospirosis depende de su prevención y diagnóstico oportuno. Algunos trabajos han demostrado que los tratamientos farmacológicos utilizados contra esta enfermedad son más efectivos si se administran en las primeras etapas del padecimiento (Koizumi & Watanabe, 2009). Las limitantes del diagnóstico oportuno son la disponibilidad de métodos directos o indirectos en los laboratorios oficiales. Por ello, en el presente trabajo se utilizó una técnica de PCR capaz de detectar la presencia de la bacteria *Leptospira* spp., en cultivos de cepas de referencia y en muestras clínicas de humanos. La PCR permitió identificar un mayor porcentaje de muestras positivas (29%) con respecto al estándar de referencia MAT (9%). El aumento en la sensibilidad de diagnóstico de técnicas moleculares con respecto

a las pruebas serológicas, también ha sido reportado por otros autores (Mullan & Panwala, 2016; Woods et al., 2017).

Las diferencias encontradas entre las pruebas son atribuibles a la misma evolución natural de la enfermedad, donde la bacteremia se observa en los primeros días de infección, cuando es más factible que sea detectable por pruebas moleculares pero no serológicas; posteriormente baja la carga bacteriana y da paso a la aparición de anticuerpos IgM, base del diagnóstico por MAT. Por lo que es importante realizar más estudios sobre la concordancia y complementariedad de las técnicas cuando se tiene solo una muestra, para tener un tratamiento más oportuno de los pacientes (Waggoner et al., 2015).

La co-infección observada de los pacientes PCR positivos con Dengue y Rickettsia, respectivamente, también ha sido observada en estudios previos (Levett, Branch & Edwards, 2000; Navarrete-Espinosa et al., 2015). La mayoría de los pacientes refieren una sintomatología clínica muy característica de la enfermedad y además presentan una similitud entre ellos en algunas manifestaciones, características observadas en otros trabajos (Ooteman et al., 2006).

Cabe mencionar que el periodo de septicemia puede llegar a durar hasta diez días después de contraída la infección, esta situación pone en mayor vulnerabilidad a personas con problemas previos de salud (por ejemplo, riñón, hígado y pulmón) pudiendo evolucionar de una manera más agresiva e incluso provocar la muerte, como pudo haber sido el caso del paciente fallecido.

**Tabla 1** Resultados de la PCR en los diferentes casos clínicos de leptospirosis evaluados por la prueba MAT

Caso	MAT (+)	MAT (-)	PCR (+)	PCR (-)	Co-infección
Positivo-infección reciente (1 : 1280)	1	-	1	-	0
Positivo-indeterminado (1 : 80 y 1 : 160)	2	-	2	-	1 (Rickettsia)
Negativo o no confirmado	-	31	7/31 (20%)	24	1 (Dengue)
Total de pacientes	3/34 (9%)	31/34 (91%)	10/34 (29%)	24/34 (71%)	2
(n = 34)					

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2 Síntomas de los pacientes positivos a leptospirosis mediante MAT y PCR

	Casos positivos e indeterminados # (n = 3)		Casos probables * (n = 7)		Total de casos (n = 10)	
	n	Porcentaje	n	Porcentaje	n	Porcentaje
Signos y síntomas						
Fiebre	3	100	7	100	10	100
Dolor de cabeza	3	100	7	100	10	100
Dolor muscular	3	100	7	100	10	100
Artralgia	3	100	6	86	9	90
Diarrea o dolor abdominal	2	66	4	57	6	60
Problemas respiratorios	2	66	3	43	5	50
Otros **	1	33	6	86	7	70
Nausea y vómitos	1	33	5	71	6	60
Dolor retro cular	1	33	5	71	6	60
Fotofobia	1	33	5	71	6	60
Conjuntivitis	1	33	4	57	5	50
Lesiones cutáneas y subcutáneas	1	33	3	43	4	40
Ictericia	1	33	0	0	1	10
Esplenomegalia	1	33	0	0	1	10
Hemorragia	0	0	2	29	2	20
Escape de líquidos ***	0	0	1	14	1	10

# Casos positivos e indeterminados mediante MAT.

\* Casos positivos mediante PCR y negativo mediante MAT.

\*\* Otros signos o síntomas: prurito, faringitis, rinitis, alteración del gusto, tos.

\*\*\* Defunción.

Fuente: Elaboración propia.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró la utilidad y beneficios que tiene la prueba de laboratorio PCR como complemento al MAT para el diagnóstico de leptospirosis sobre todo en los primeros días de la enfermedad y en aquellos pacientes donde se carece de muestras pareadas. Implementarla de forma rutinaria permitiría un diagnóstico más oportuno y preciso en la evolución de la enfermedad y lograría reducir el índice de casos indeterminados y falsos negativos que se presentan en muchos de los casos donde solo se realiza el MAT, situación de suma importancia desde el punto de vista de salud pública.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico para la realización de este trabajo a la Universidad de Sonora, al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Prodep) (proyecto 103.5/07/2362,) y al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora, México. Se agradece el excelente trabajo del Q.B. Alberto Ramírez Cons en la determinación de prueba MAT y cultivos de *Leptospira*.

## REFERENCIAS

- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & Andre-Fontaine, G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 243(2), 437-445.
- De Abreu, C., Teixeira, V. L., Caló, E., Spinosa, C., Arroyo, M. C., Da Silva, M. V., & Shikanai, M. A. (2006). Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health*, 11(11), 1699-1707.
- García-Ruiz, D., Martínez-Guzmán, M., Cárdenas-Vargas, A., Marino-Marmolejo, E., Gutiérrez-Ortega, A., González-Díaz, E., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Norieg, E., Pérez-Gómez, H., & Elizondo-Quiroga, D. (2016). Detection of dengue, west Nile virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy. *Springer Plus*, 5(1) 1. doi: <http://doi.org/10.1186/s40064-016-2318-y>
- Hartskeerl, R. A. (2006). Leptospirosis: Current status and future trends. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(4), 309.

- Koizumi, N., & Watanabe, H. (2009). Leptospirosis. En A. Barrett, & L. Stanberry, (Eds.). *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* (1291-1308). London: Academic Press. doi: <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00064-0>
- Kumaran, S., Bakar, M., Mohd-Padil, H., Mat-Sharani, S., Sakinah, S., Poorani, K., Alsaedy, H., Peli, A., Wei, T., Ling, M., Hamat, R., Neela, V., Higuchi, A., Alarfaj, A., Rajan, M., Benelli, G., Arulselvan, P., & Kumar, S. (2017). 3D modelling of the pathogenic *Leptospira* protein LipL32: A bioinformatics approach. *Acta Tropica*, *176*, 433-439. doi: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.011>.
- Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V., & Prapasarakul, N. (2017). Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Research in Veterinary Science*, *115*, 146-154. doi: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.017>.
- Levett, P. N., Branch, S. L., & Edwards, C. N. (2000). Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *62*(1), 112-114.
- Levett, P. N. (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiological Reviews*, *14*(2), 296-326.
- Levett, P. N., & Branch, S. L. (2002) Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(6), 745-748.
- Mullan, S., & Panwala, T. H. (2016). Polymerase Chain Reaction: An Important Tool for Early Diagnosis of Leptospirosis Cases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *10*(12), 8-11. doi: <http://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22462.9010>
- Navarrete-Espinosa, J., Rivas-Sánchez, B., Grajales-Muñiz, C., González-Bonilla, C. R., Marín-Pavón, M. C., Carmona-González, E., López-Balam, M., Blanco-Ortega, R., & Borja-Aburto, V. H. (2015). Prevalencia de dengue, leptospirosis y rickettsiosis en pacientes sospechosos de dengue atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social, 2012. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *67*(2), 150-164.
- Ooteman, M., Vago, A., & Koury, M. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Microbiological Methods*, *65*(2), 247-257.
- Riediger, I. N., Stoddard, R. A., Ribeiro, G. S., Nakatani, S. M., Moreira, S., Skraba, I., Biondo, A. W., Reis, M. G., Hoffmaster, A., Vinetz, J. M., Ko, A. I., & Wunder, E. A. (2017). Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(9), 1-14. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005940>
- Sánchez-Montes, S., Espinoza-Martínez, D., Ríos-Muñoz, C. A., Bersunza-Cruz, M., & Becker, I. (2015). Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and Potential Distribution of Human Cases. *PLoS One*, *10*(7), 1-16. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0133720>.
- Secretaría de Salud. (2012). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis*. México. Recuperado el 5 de septiembre del 2015 de [http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/14\\_Manual\\_Leptospirosis.pdf](http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/14_Manual_Leptospirosis.pdf)
- Secretaría de Salud. (2017). *Boletín Epidemiológico*. México: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Recuperado el 18 de febrero de 2018 de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/285868/sem52.pdf>
- Vivian, J., Beddoe, T., McAlister, A. D., Wilce, M., Zaker-Tabrizi, L., Troy, S., Byres, E., Hoke, D., Cullen, P., Lo, M., Murray, G., Adler, B., & Rossjohn, J. (2009). Crystal Structure of LipL32, the Most Abundant Surface Protein of Pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of Molecular Biology*, *387*(5), 1229-1238. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.038>.
- Waggoner J. J., Balassiano I., Mohamed-Hadley A., Vital-Brazil J. M., Sahoo M. K., & Pinsky B. A. (2015). Reverse-Transcriptase PCR Detection of *Leptospira*: Absence of Agreement with Single-Specimen Microscopic Agglutination Testing. *PLoS One*, *10*(7), 1-11. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132988>.
- World Health Organization (WHO). (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Recuperado el 5 de septiembre de 2015 de [http://www.who.int/csr/don/en/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf?ua=1](http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?ua=1)
- World Health Organization (WHO). (2011). *Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group*. Recuperado el 10 de septiembre de 2015 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521_eng.pdf)
- Woods, K., Nic-Fhogartaigh, C., Arnold, C., Boutthasavong, L., Phuklia, W., Lim, C., Chanthongthip, A., Tulsiani, S. M., Craig, S. B., Burns, M. A., Weier, S. L., Davong, V., Sihalath, S., Limmathurotsakul, D., Dance, D. A. B., Shetty, N., Zambon, M., Newton, P. N., & Dittrich, S., (2017). A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. *Clinical Microbiology and Infection*. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.017>.