

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**“VALIDACIÓN ANALÍTICA DE UNA PLATAFORMA DE PCR EN  
TIEMPO REAL BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN  
LIPL32 PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES PATÓGENAS DE  
*LEPTOSPIRA* EN MUESTRAS DE SANGRE”**

**TESIS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

**JOSÉ GUADALUPE GUERRERO VELÁZQUEZ**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO**

CO-DIRECTOR DE TESIS

**DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, AGOSTO DE 2017

**Validación Analítica de una Plataforma de PCR en Tiempo Real Basada en la Amplificación del Gen LipL32 para la Detección de Especies Patógenas de *Leptospira* en Muestras de Sangre. Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para la obtención del grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

---

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO  
DIRECTOR DE TESIS

---

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

DR. SERGIO ARTURO CUETO GONZÁLEZ  
ASESOR

---

DR. JOSÉ CARLOMAN HERRERA RAMÍREZ  
ASESOR

## RESUMEN

### **Validación Analítica de una Plataforma de PCR en Tiempo Real Basada en la Amplificación del Gen LipL32 para la Detección de Especies Patógenas de *Leptospira* en Muestras de Sangre**

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial causada por especies patógenas del género *Leptospira*. La leptospirosis afecta a especies animales dedicadas a la producción de alimentos y animales de compañía. El diagnóstico de leptospirosis se basa en la prueba de microaglutinación (MAT) que se considera como prueba de referencia, sin embargo; está disponible solo en laboratorios de referencia con personal calificado y estrictas normas de bioseguridad. Aunque MAT sigue siendo la prueba de referencia a nivel mundial, requiere de 7 a 10 días para su realización, no detecta anticuerpos en los primeros días de la infección y tampoco puede distinguir entre un caso de infección natural, la respuesta de anticuerpos por administración de vacunas o si la respuesta es debido a una infección previa. El diagnóstico de la leptospirosis empleando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) basado en la amplificación del gen que codifica para la proteína de fusión LipL32, ha sido probado y documentado en numerosos artículos científicos desde principio de la década pasada. A pesar de las ventajas técnicas que resultan del desarrollo de plataformas de diagnóstico molecular para leptospirosis, en la actualidad no se cuenta con reportes de validación analítica para ninguno de los procedimientos disponibles en las bases de datos públicas, lo que significa que esas plataformas no han sido sometidas a procesos estandarizados para evaluar y medir sus parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe, de tal forma que las pruebas garanticen altos niveles de repetibilidad y reproducibilidad en los resultados, independientemente del laboratorio que las ejecute. En este trabajo se logró exitosamente la validación analítica de una plataforma RT-PCR que detecta y amplifica un fragmento de ADN del gen que codifica para la proteína de fusión conocida como LipL32. La validación analítica de la plataforma RT-PCR de LipL32 surge como respuesta a la necesidad de una herramienta de diagnóstico confiable,

precisa y rápida para detectar leptospirosis, una enfermedad que se caracteriza por desarrollar una serie de signos y síntomas que por sí solos no proporcionan evidencia suficiente para declarar la enfermedad, donde la serología es complicada de realizar y produce resultados inconclusos o el cultivo microbiológico, que toma demasiado tiempo para producir un resultado positivo, ocasionando en cualquiera de esos casos, retrasos en la iniciación de la terapia con antibióticos y repercutiendo en el tiempo requerido para recuperar el estado de salud. De los resultados del proceso de validación, el parámetro precisión entre y dentro de las corridas para cada categoría del ciclo de amplificación demostraron alta repetibilidad y reproducibilidad al obtenerse una media de 18.58 ciclos con una desviación estándar total de 1.35 y un coeficiente de variación total de 7.3%, lo cual indica que entre y dentro de las 20 corridas se presentó una imprecisión menor a 2 ciclos. Para la variable temperatura de fusión ( $T_m$ ) se obtuvo un promedio de 81.84 °C precisión entre y dentro de las corridas con una desviación estándar total 0.31 y un coeficiente variación total 0.4%. Los resultados para  $T_m$  entre y dentro laboratorios produjeron un promedio de 81.85 °C con una desviación estándar de 0.304 y un coeficiente de variación total de 0.40, demostrando muy baja variabilidad entre y dentro corridas tanto en un solo laboratorio como entre y dentro de los dos laboratorios utilizados. Los resultados del parámetro exactitud presentaron un sesgo de -0.06 para las 440 observaciones con un promedio de 81.84 °C con un valor óptimo de referencia calculado en 82.0°C de acuerdo a la temperatura de disociación de producto amplificado del gen LipL32, lo cual demuestra estadísticamente que el 100% de las réplicas (IC 95%) estuvieron dentro del rango 81.0°C a 83.0°C de la temperatura de fusión calculada y permitieron establecer el punto de corte entre muestras positivas y negativas. Asimismo, el parámetro de rango de informe se cumple al resultar el 100% de las muestras positivas con resultado positivo y el 100% de los controles negativos de referencia con resultado negativo. El límite detección de la plataforma RT-PCR para LipL32 fue establecido en 10 equivalentes genómicos por reacción de 10  $\mu$ l en la dilución  $10^{-6}$  del ciclo 38.8. Se concluye que la plataforma RT-PCR de LipL32 fue exitosamente validada al probar un número suficiente de muestras en un número de repeticiones que duplica el mínimo requerido por organizaciones internacionales dedicadas al control de calidad y que los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe que resultan en una plataforma

robusta y confiable para ser aplicada en el diagnóstico molecular de leptospirosis en muestras de sangre de perros.

## ABSTRACT

### **Analytical Validation of a real-time PCR platform based on the amplification of the LipL32 gene for detection of pathogenic species of *Leptospira* in blood samples**

Leptospirosis is a bacterial zoonosis of global distribution caused by pathogenic species of the genus *Leptospira*. Leptospirosis affects animal species dedicated to the production of food and companion animals. Currently, the diagnosis of leptospirosis is based on the micro-agglutination test (MAT) which is considered as reference test, however; is available only in reference laboratories with qualified personnel and strict biosafety standards. Although MAT remains the reference test worldwide, it requires 7 to 10 days for its completion, it does not detect antibodies in the first days of infection and cannot distinguish between a case of natural infection from an antibody response due the administration of vaccines or if the response is the result of a previous infection. The diagnosis of leptospirosis using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques based on the amplification of the gene encoding the LipL32 fusion protein, has been tested and documented in numerous scientific articles since the beginning of the past decade. Despite the technical advantages resulting from the development of molecular diagnostic platforms for leptospirosis, currently, there are no reports of analytical validation for any of the procedures available in the public databases, which means these platforms have not been submitted to standardized procedures to evaluate and measure their parameters of precision, accuracy, analytical sensitivity and reporting range, so that the tests can guarantee high levels of repeatability and reproducibility in the results, regardless of the laboratory that executes them. In this work, the analytical validation of a RT-PCR platform was successfully achieved, which detects and amplifies a DNA fragment of the gene encoding for the fusion protein LipL32. The analytical validation of the LipL32 RT-PCR platform arises as a response to the need for a reliable, accurate and rapid diagnostic tool to detect leptospirosis, a disease characterized by a series of signs and symptoms that alone do not provide sufficient evidence to declare the disease, where serology is complicated to perform and produces inconclusive results or microbiological culture, which takes too long to produce a positive result, causing

in any of these cases, delays in the initiation of antibiotic therapy and reflects on the time required to recover the state of health. From the results of the validation process, the precision parameter between and within the runs for each category of the amplification cycle demonstrated high repeatability and reproducibility, resulting in an average of 18.58 cycles with a total standard deviation of 1.35 and a total variation coefficient of 7.3%, indicating that between and within the 20 runs of experiments an imprecision of less than 2 cycles. For the variable melting temperature ( $T_m$ ) an average of 81.84 ° C was obtained between and within the runs with a standard deviation of 0.31 and a coefficient of variation of 0.4%. The results for  $T_m$  between and within laboratories produced an average of 81.85 ° C with a standard deviation of 0.304 and a total coefficient of variation of 0.40, showing very low variability between and within runs in either a single laboratory and between and within the two laboratories used. The results of the accuracy parameter showed a bias of -0.06 for the 440 observations with an average of 81.84 ° C with an optimum reference value calculated at 82.0 ° C according to the dissociation temperature of the amplified product of the LipL32 gene, which shows that 100% of the replicates (95% CI) were within the range 81.0 ° C to 83.0 ° C of the calculated  $T_m$ , allowing to establish the cut-off point between positive and negative samples. Likewise, the parameter report range was met by obtaining 100% of positive control samples with a positive result and 100% of negative reference controls with a negative result. The limit detection of the RT-PCR platform for LipL32 was established in 10 genomic equivalents by reaction of 10 µl at the dilution  $10^{-6}$  at cycle 38.8. It is concluded that the LipL32 RT-PCR platform was successfully validated by testing a sufficient number of samples in a number of replicates that duplicate the minimum required by international organizations dedicated to quality control and that the parameters of precision, accuracy, analytical sensitivity and report range, resulting in a robust and reliable platform that can be applied for the molecular diagnosis of leptospirosis in blood samples from dogs.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Etiología.....	5
Epidemiología.....	6
Patogénesis.....	8
Cuadro clínico.....	10
Diagnóstico.....	11
<i>Bacteriológico</i> .....	11
<i>Serológico</i> .....	11
<i>Molecular</i> .....	12
Gen LipL32 .....	13
Validación .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Muestras.....	15
Diseño de oligonucleótidos para LipL32.....	16
Reconstitución de oligonucleótidos.....	17
Mezcla maestra.....	18
Diseño del experimento de validación.....	18
Pruebas RT-PCR.....	19
Interpretación de resultados.....	19
Resultados.....	20
DISCUSIÓN.....	23

LITERATURA CITADA .....	29
ANEXOS.....	36

## LISTA DE CUADROS

1.- Especies y serovariedades del género <i>Leptospira</i> .....	5
2.- Hospedadores de mantenimiento y accidental importantes para serovariedades de <i>Leptospiras</i> patógenas.....	7
3.- Diluciones de ADN amplificado RT-PCR de LipL32 para producir muestras adicionadas.....	16
4.- Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de LipL32 con referencia <i>GenBank</i> JN886739.1.....	17
5.- Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de <i>Leptospira</i> .....	19
6.- Resultados del parámetro precisión del RT-PCR para LipL32.....	23

## LISTA DE FIGURAS

1.- Ciclo epidemiológico de leptospirosis.....	7
--	---

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana causada por especies patógenas del género *Leptospira*, la enfermedad se presenta en todo el mundo y es considerada un padecimiento re-emergente, principalmente en regiones tropicales y países del tercer mundo. La infección por *Leptospira* se ha reportado en más de 150 especies de mamíferos y por su carácter zoonótico representa un serio problema de salud pública (Chen et al., 2013; Sykes et al., 2011). A nivel mundial, durante el año 2015, se reportaron poco más de un millón de casos severos de leptospirosis y 58,900 muertes debido a esta enfermedad (Costa et al., 2015). En México, la leptospirosis está clasificada como una enfermedad de notificación obligatoria mensual. De acuerdo con el Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud, durante el año 2016 se reportaron 261 casos en humanos (Secretaría de Salud, 2017), aunque se desconoce la tasa de mortalidad por esta enfermedad en nuestro país.

En el ámbito de la Medicina Veterinaria, la leptospirosis afecta tanto a especies animales dedicadas a la producción de alimentos como a animales de compañía y otras mascotas. En las especies animales dedicadas a la producción de alimentos, la infección por *Leptospira* ocasiona problemas reproductivos que se manifiestan con tasas bajas de fecundidad, problemas de infertilidad, abortos, nacimiento de crías débiles, disminución de la producción de leche y alta mortalidad en animales jóvenes, resultando en pérdidas económicas que podrían alcanzar un 30% del valor de la unidad de producción pecuaria afectada (Tilahun, et al., 2013). Para el caso de mascotas y animales de compañía, los perros representan el principal riesgo de transmisión zoonótica y por lo tanto un serio problema de salud pública, como lo demuestran resultados presentados por la compañía IDEXX en los Estados Unidos entre los años 2000 a 2014 encontrando una prevalencia de 14.21% de leptospirosis en perros empleando la prueba de micro aglutinación (MAT) en un universo de 87,355 muestras de suero (White et al, 2017).

El diagnóstico de la leptospirosis es difícil de establecer debido a que la enfermedad puede desarrollar distintas manifestaciones clínicas con síntomas muy variados que pueden ir desde una enfermedad leve con síntomas de tipo gripal, o bien; desarrollar el síndrome de Weil, caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias; en casos más graves se puede presentar meningitis, meningo-encefalitis o hemorragia pulmonar con falla respiratoria. Con un período de incubación que puede ser de 5 a 14 días, los síntomas más frecuentes de la infección por *Leptospira* son fiebre, dolor de cabeza, mialgias, infección conjuntival, ictericia y malestar general, lo cual hace que la leptospirosis se confunda con otras enfermedades infecciosas y no infecciosas entre las que destacan influenza, dengue, infección por Hantavirus, fiebre amarilla y otras fiebres hemorrágicas virales, rickettsiosis, borreliosis, brucelosis, malaria, meningitis aséptica, intoxicación por sustancias químicas, intoxicación alimentaria, fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas, hepatitis virales, enfermedad de legionario, toxoplasmosis y mononucleosis infecciosa, por mencionar solo algunas (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Para el diagnóstico de leptospirosis la prueba de micro-aglutinación o MAT es la prueba de referencia más aceptada, sin embargo; solo se practica en laboratorios de referencia que cuentan con un número determinado de cepas patógenas de *Leptospira* bien caracterizadas. No obstante su amplia aceptación como prueba de referencia, el MAT es sensible hasta la segunda semana de la enfermedad cuando la concentración de anticuerpo circulante es suficiente para producir un resultado positivo a esta prueba. Además, el MAT requiere de un procedimiento complejo, personal entrenado con agentes patógenos peligrosos, pero sobre todo, contar con un panel representativo de cepas vivas de *Leptospiras* disponibles para la realización de esta prueba (Chen et al., 2013). Las alternativas a la prueba MAT para el diagnóstico de leptospirosis son el ELISA y el cultivo microbiológico (Ahmed et al., 2009). Cada una de ellas presenta ventajas y limitantes técnicas para su ejecución en distintos escenarios, sin embargo; ninguna de estas dos alternativas resuelven el problema del diagnóstico temprano, ya que el ELISA depende de una cantidad mínima de anticuerpos para producir un resultado positivo, extendiendo a 10 o 15 días el tiempo necesario para que el

sistema inmune genere una respuesta de anticuerpos detectable (Chirathaworn et al., 2011) y el cultivo microbiológico requiere de semanas para producir un resultado positivo o negativo confirmatorio (Ehsanollahet at., 2011).

En 1983 Kari Mullis desarrolló la técnica de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) con una amplia gama de aplicaciones diagnosticas que con el tiempo se convertiría en una herramienta indispensable en el laboratorio clínico y en investigación, al lograr la amplificación del ADN a partir de muestras clínicas como sangre, orina o tejidos para la detección de pequeñas cantidades de microbios con altos niveles de sensibilidad y especificidad. Las técnicas PCR fueron mejoradas en la década de los 90's con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Paffafl et al., 2010).

Las primeras plataformas de PCR convencional o en tiempo real empleadas para el diagnóstico de leptospirosis en humanos estaban diseñados para amplificar los genes 16S rRNA, gyrB y secY, los cuales se comparten y expresan por cepas de *Leptospira* patógenas y saprófitas (Haake et al., 2000; Cullen et al., 2004). Posteriormente se utilizaron genes cuya expresión es específica de las serovariedades de *Leptospira* patógenas, dentro de los que destacan los genes que codifican para las proteínas de adhesión LipL32, LigA y LigB (Murray et al., 2013; Hauk et al., 2008; Vieira et al., 2013). Dentro de este grupo de genes, LipL32 es considerado un gen candidato para plataformas de diagnóstico molecular de leptospirosis temprano y específico ya que LipL32 codifica para una lipoproteína inmunodominante que representa el 75% del proteoma de la membrana externa de las *Leptospiras*, está altamente conservado y se expresa exclusivamente entre las cepas patógenas y completamente ausente en las cepas saprófitas (Stoddard et al., 2009; Hauk et al., 2008; Murray et al., 2013; Vieira et al., 2013).

A pesar que se han publicado múltiples estudios basados en PCR convencional o en tiempo real que utilizan como gen blanco un fragmento de LipL32 que amplifica e identifica correctamente las distintas especies de

leptospiras patógenas a partir de distintos tipos de muestras, la validación analítica de esos procedimientos no se ha realizado o bien, se ha documentado con un número reducido de muestras y repeticiones, sin que a la fecha se cuente con un protocolo RT-PCR validado con el número de muestras y repeticiones recomendado por los organismos certificadores internacionales (González et al., 2013, Moreno et al., 2010; Stoddard et al., 2009; Villunsem et al., 2012). La validación analítica para una nueva prueba diagnóstica es necesaria y tiene como objetivo conocer las características analíticas del método y su error analítico total para después compararlo con especificaciones de calidad, reproducibilidad y repetibilidad. Con esta información es posible establecer si el método validado propuesto, es capaz de generar las características de calidad requeridas para ser utilizado con muestras clínicas de pacientes cursando una enfermedad (*FDA Guidance for Industry–Bioanalytical Method Validation guidelines, 2015, OIE Validation Recommendations, 2014*).

**Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo es la validación analítica una plataforma de PCR en tiempo real basada en la amplificación del gen LipL32 para detectar leptospiras patógenas en muestras de sangre de perro.**

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Etiología

El agente etiológico de la leptospirosis son un grupo de espiroquetas pertenecientes a la familia *Leptospiraceae* del orden *Spirochaetales*. En general, las leptospiras presentan una conformación helicoidal con una longitud aproximada entre 6 y 20 micras ( $\mu\text{m}$ ) con aproximadamente  $0.1 \mu\text{m}$  de diámetro y apariencia de gancho en uno o en ambos extremos; poseen dos filamentos axiales que se encuentran dentro de su cuerpo en el espacio periplásmico que les permite desplazarse con un movimiento giratorio el cual es una de las características más importantes de su patogenicidad. Debido a su longitud y a que son muy delgadas no son visibles al microscopio óptico de luz convencional, por lo cual es necesario utilizar un microscopio de campo oscuro para su visualización (Azocar-Aedo et al., 2014; Quinn et al., 2011). De acuerdo a los estudios de las secuencias del gen 16S rRNA, las leptospiras se clasifican genotípicamente en 22 especies, 10 de las cuales son patógenas, 5 intermedias y 7 saprófitas. Asimismo, existe una clasificación serológica que las agrupa en más de 300 serovariedades que se fundamentan en diferencias antigénicas presentes en su estructura de lipopolisacáridos (Fouts et al., 2016, Picardeu et al., 2017).

**Cuadro 1.** Especies y serovariedades del género *Leptospira*.

Espece	Serovariedad
<ul style="list-style-type: none"> <li>L. alexanderi</li> <li>L. interrogans</li> <li>L. alstonii</li> <li>L. mayottensis</li> <li>L. weiiii</li> <li>L. kirschneri</li> <li>L. Kmetyi</li> <li>L. borgpetersenii</li> <li>L. noguchii</li> <li>L. santarosai</li> </ul>	<p>Autumnalis, , Canicola, Grippotyphosa Copenhageni, Icterohaemorrhagiae</p> <p>Lai, Pomona Ballum, Hardjobovis Panama</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>L. licerasiae</li> <li>L. wolffii</li> <li>L. fainei</li> <li>L. broomii</li> <li>L. inadai</li> </ul>	<p>especies intermedias</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>L. idonii</li> <li>L. meyeri</li> <li>L. yanagawae</li> <li>L. terpstrae</li> <li>L. wolbachii</li> <li>L. vanthielii</li> <li>L. biflexa</li> </ul>	<p>especies saprófitas</p>

Las leptospiras patógenas poseen una estructura de doble membrana donde la membrana citoplasmática y la pared celular están estrechamente relacionadas y se superponen por una membrana externa. En la membrana externa, los lipopolisacáridos (LPS) constituyen uno de los principales antígenos de este microorganismo, además de distintas lipoproteínas estructurales y funcionales denominadas LipL32, LipL21 y LipL41, las cuales conforman parte de la membrana externa y se expresan abundantemente en la superficie de la bacteria (Cullen et al., 2004; Cullen et al., 2005). De las lipoproteínas que conforman la membrana externa de las *Leptospiras* destaca LipL32, una proteína de 32 kilodaltones (kDa) que se expresa exclusivamente en las especies patógenas probadas hasta la fecha y cuyo gen es altamente conservado entre ellas con un promedio de identidad de aminoácidos de más del 98%. Se ha demostrado que este gen no se expresa en las especies saprófitas de esta familia de microbios (Murray et al., 2013).

## **Epidemiología**

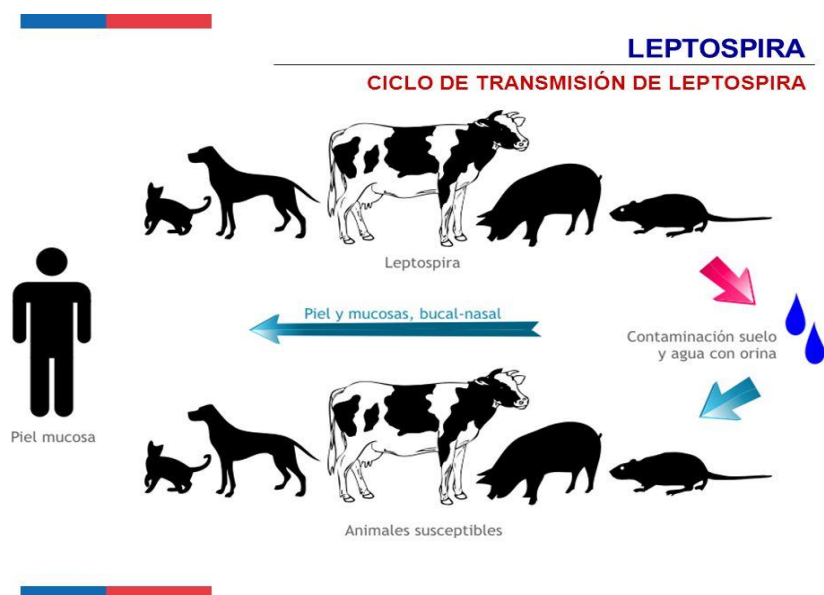
La leptospirosis es una de las enfermedades zoonóticas más ampliamente distribuida a nivel mundial, se asocia con el clima tropical, subtropical y en zonas donde la situación económica de pobreza favorece la existencia y proliferación de leptospiras, representando un riesgo para la población (Pappas et al., 2008). La mayoría de serovariedades se asocian a reservorios particulares en determinadas especies animales que actúan como huéspedes de mantenimiento, siendo estos los principales contaminadores del medio ambiente principalmente a través de la orina y restos de fetos abortados infectados, lo que facilita que otras especies se infecten y enfermen severamente, la infección también ocurre de forma accidental al entrar en contacto directo con agua, alimentos y productos contaminados (Quinn et al., 2011). La presencia de la enfermedad es más común durante la temporada de lluvias, durante el final del verano y principios de otoño en regiones tropicales, siendo la mayoría de los países del sudeste asiático endémicos a leptospirosis. En recientes años se han reportado brotes en Latinoamérica (Alfaro et al., 2004; Hartskeerl et al., 2011; Tilahun et al., 2013).

**Cuadro 2.** Hospedadores de mantenimiento y accidental importantes para serovariedades de *Leptospiras* patógenas.

Serovariedad	Mantenimiento	Accidental
Bratislava	Cerdos, Caballos	Humano, perros
Canicola	Perros	Bovinos, cerdos
Grippotyphosa	Roedores	Bovinos, cerdos, perros
Hardjo	Bovinos, ovejas	Humano
Icterohaemorrhagiae	Ratas	Humano
Pomona	Cerdos, bovino	Ovejas, caballos, perros

Fuente: *Veterinary Microbiology and Disease, 2011, (2nd Ed.)*

**Figura No 1.** Ciclo epidemiológico de la leptospirosis



Fuente: [http://cesarcalderson.hol.es/images/galeria\\_web/vectores/enfermedades.html](http://cesarcalderson.hol.es/images/galeria_web/vectores/enfermedades.html)

Los reportes de prevalencia de leptospirosis a nivel mundial no se conocen con exactitud debido a las dificultades para establecer un diagnóstico preciso, por lo que el sub-registro es frecuente. Sin embargo, existen datos que estiman una tasa de infección a nivel mundial de 5-14 personas por cada 100,000 habitantes con una tasa de mortalidad 3-50% (Hartskeerl et al., 2011; Secretaria de Salud, 2012; Petrakowsky et al., 2014; Haake et al., 2015). En México tampoco se conoce la prevalencia real de la enfermedad aunque un estudio realizado entre los años 2000-2005 se identificaron 9,261 casos seropositivos (Secretaria de Salud, 2012) para una tasa general de 8.4 casos por cada 100,00 habitantes, datos que coinciden con los rangos de prevalencia mundial.

En Medicina Veterinaria se ha documentado la presencia de leptospiras en perros y gatos con tasas de prevalencia para los Estados Unidos de 4.9-24%, en Brasil 6.9-28.4%, en Canadá 0-6%, en Grecia 11-33%, en Irán 4.9-33% y en Nueva Zelanda 8.2-14.2% (Azocar-Aedo et al., 2014). Los reportes de prevalencia de leptospirosis en ganado bovino de distintas regiones de México han demostrado la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en 50.4 % de las muestras analizadas provenientes de 20 estados del país, con animales positivos presentes en las cinco regiones ecológicas de la República Mexicana, con reportes de frecuencia más alta en regiones húmedas y tropicales (64.2%) comparada con un 37.8% reportado para las regiones áridas (Luna et al., 2015). Los reportes para cerdos indican una prevalencia de 39.8% a partir de MAT en distintas granjas del centro y sur de México, con reactividad a una o más serovariedades de leptospiras (Cisneros et al., 2002). En animales de compañía se cuenta con reportes de 38.1% de prevalencia de leptospirosis a partir de MAT para perros capturados por el Centro de Control Animal Luis Pasteur de la ciudad de México (Rivera et al., 1999).

## **Patogénesis**

Una gran cantidad de especies de animales silvestres y domésticos adquieren la infección por *Leptospira* al entrar en contacto directo con orina y/o fuentes de agua contaminada, esto ocurre debido a que las leptospiras pueden penetrar a través de heridas, abrasiones, piel húmeda, superficies mucosas como

la conjuntiva, mucosa oral, garganta y conductos nasales, hasta llegar a los túbulos renales (Monahan et al., 2009). Esta enfermedad cursa un cuadro clínico bifásico después de un período de incubación de 4-19 días. Durante la primera fase se desarrolla un cuadro de bacteriemia (leptospiemia) durante el cual la bacteria circula por el torrente sanguíneo hasta por 7 días, después aparece la fase inmune (leptospiuria) donde los anticuerpos se unen a la bacteria y desaparece de la circulación permaneciendo en los túbulos renales, donde se puede producir una excreción crónica del microbio en orina durante semanas, meses o incluso años (Marinho et al., 2014).

Las especies patógenas de *Leptospira* utilizan ciertas moléculas de su membrana exterior para adherirse a la matriz celular de los epitelios del hospedador y trasladarse a través de células monocapa sin alterar la resistencia transepitelial, evadiendo al sistema inmune y diseminándose rápidamente por los órganos (Cinco, 2010). Dentro los componentes de la matriz celular y ligandos a los que se unen las leptospiras patógenas se han reportado la laminina, el colágeno I y IV, la fibronectina, el fibrinógeno, la elastina y algunos proteoglicanos. Se ha documentado que las leptospiras patógenas son capaces de unirse a monocitos, macrófagos, células epiteliales de riñón y fibroblastos (Fraga et al., 2011). Jin y colaboradores (2009) sugieren que este patógeno es capaz de inducir apoptosis en macrófagos por activación de la caspasa-3 y 6 mediada por la ruta dependiente *Fas* asociado al dominio de muerte (*FAAD*)-caspasa-8 con lo cual sería una vía de evasión de la respuesta inmune innata. Asimismo, Fraga y colaboradores (2014) reportaron que *L. interrogans* secreta proteasas que inhiben 3 rutas del sistema complemento al romper las cadenas alfa y beta de C3, el factor B, C2 y C4b, sugiriendo la participación de metaloproteasas. Sin embargo, se requiere de más estudios sobre la patogénesis de esta enfermedad para establecer cuáles son los principales mecanismos de patogenicidad y evasión del sistema inmune por parte de las leptospiras (Cinco, 2010).

### **Cuadro clínico**

En perros, la leptospirosis se puede presentar con cuadros de enfermedad leve, severa o asintomática dependiendo de la cepa que infecta al animal. En los

casos de enfermedad severa, durante fase aguda se presenta fiebre, acompañado de dolor muscular, escalofríos. En perros que presentan falla renal, también pueden presentar poliuria, polidipsia, deshidratación, vómitos, diarrea, inapetencia, letargo, dolor abdominal, insuficiencia hepática, disnea y taquipnea (Sykes, et al., 2011). En bovinos durante la infección por *Leptospira* se presenta fiebre, anorexia, disminución de la producción de leche, mastitis atípica, retención placentaria, abortos, ictericia, anemia, hepatomegalia, nefritis, hemoglobinuria, deshidratación, disnea, meningitis y muerte (Tilahun et al., 2013). Los cerdos actúan como hospedador de mantenimiento de las serovariedades Pomona, Bratislava y Tarassovi, produciendo mortalidad en lechones con signos y síntomas similares a los que se presentan en la fase aguda de otras especies, además de problemas reproductivos, abortos y mortinatos (Quinn et al., 2011). El cuadro clínico de leptospirosis en ovinos se caracteriza por fiebre, ictericia, hemoglobinuria, falla reproductiva, disminución en la producción de leche, abortos en tercer tercio de gestación, muerte de corderos débiles, infertilidad, mortinatos, septicemia en la fase aguda, fiebre, disnea, debilidad y muerte (Luchels et al., 2011).

Los humanos infectados con leptospirosis presentan síntomas después de 7-12 días del contagio, manifestando cuadros clínicos que van desde enfermedad leve, enfermedad febril autolimitada y fulminante. En los dos últimos casos puede presentarse dolor de cabeza, dolor muscular, ictericia, conjuntivitis, tos, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, pancreatitis, perfil de transaminasas hepáticas elevado, leucocitosis, trombocitopenia, leucopenia, melena, petequias, hemorragia pulmonar, hematuria, piuria, elevación del nivel de creatinina y urea y falla renal (Haake et al., 2015).

## **Diagnóstico**

### ***Bacteriológico***

El cultivo y aislamiento microbiológico de *Leptospira* es un procedimiento diagnóstico poco eficaz ya que requiere de 30-90 días de incubación con niveles de sensibilidad de 5-50%. El uso del cultivo microbiológico como herramienta de diagnóstico clínico no es viable ni recomendado ya que para tratar exitosamente

la infección por *Leptospira*, la enfermedad debe ser diagnosticada antes del séptimo día de infección para que la terapia con antibióticos resulte efectiva (Ehsanollah et al., 2011., Hartskeerl et al 2011, Hakee et al., 2015).

### **Serológico**

Para el diagnóstico serológico de leptospirosis se utiliza la prueba de microaglutinación (MAT) que utiliza antígenos obtenidos de un panel de cepas de referencia de leptospiros patógenas que son incubadas por un periodo de 7-10 días. Los resultados de esta prueba se obtienen al leer una laminilla con la mezcla del antígeno correspondiente, la muestra de suero sanguíneo como fuente de anticuerpos y observado bajo un microscopio de campo oscuro. La prueba utiliza diluciones seriadas del suero donde el punto de corte del título se determina con la dilución más alta que produjo al menos 50% aglutinación, considerándose una muestra como positiva cuando el título es  $\geq 100:1$  (Ehsanollah et al., 2011). Aunque MAT sigue siendo la prueba de referencia a nivel mundial, requiere tiempo en su realización, no detecta anticuerpos en los primeros días de la infección, está disponible solo en laboratorios especializados con personal calificado y es necesario el mantenimiento de cepas vivas (Chirathaworn et al., 2011). MAT ofrece resultados con sensibilidad de 90% y especificidad de  $>90\%$ , mientras la alternativa de serodiagnóstico ELISA ofrece una sensibilidad de 84-90% y una especificidad de 88-99% (Hartskeerl, et al., 2011). Además de la baja sensibilidad en etapa temprana de infección, otras pruebas que utilizan anticuerpos no pueden distinguir de infección natural de anticuerpos vacunales o infecciones previas (Xu et al., 2014).

### **Molecular**

Las pruebas de amplificación de ADN como son el PCR convencional y RT-PCR han demostrado ser rápidas, sensibles y específicas para la detección de microbios a partir de pequeñas cantidades del microorganismo obtenido a partir de una gran variedad de muestras clínicas como sangre, orina, tejido, exudados etc., (Ahmed et al., 2009). Desde la década de 1990 se han desarrollado e instrumentado diversos métodos PCR para el diagnóstico de leptospirosis en humanos basados en la amplificación de regiones con alto valor diagnóstico localizadas en genes blanco como el 16S rRNA, gyrB y secY, flaB, secY, que por

ser genes compartidos por especies tanto patógenas como saprofitas, no habían logrado mejorar la exactitud del diagnóstico de leptospirosis (Ahmed et al., 2009; Moreno et al., 2010; Waggoner et al., 2014). Posteriormente se utilizaron genes cuya expresión es específica y limitada a las serovariedades de leptospiras patógenas en plataformas de RT-PCR, de ellos destacan los genes que codifican para las proteínas de adhesión LipL32, LigA y ligB (Murray et al., 2013; Hauk et al., 2008; Vieira et al., 2013).

Las pruebas RT-PCR más comunes para detección de leptospiras patógenas basadas en el uso del gen LipL32 utilizan los fluoróforos SYBR Green, EVA Green y sondas TaqMan que tienen la ventaja de producir un resultado más rápido que el PCR convencional y un menor riesgo de contaminación, además que elimina el uso de cepas vivas que requiere la prueba serológica MAT (Ahmed et al., 2009; Stoddard et al., 2009, Xu et al., 2014). En Europa, los reportes de resultados empleando RT-PCR que amplifica LipL32 demuestran niveles de sensibilidad y especificidad de 100% al utilizar muestras de orina y 86% de sensibilidad y 100% de especificidad en muestras de sangre (Villunsem et al., 2012). En los Estados Unidos se han reportado niveles de sensibilidad y especificidad del 100% en muestras de sangre empleando un RT-PCR que amplifica un fragmento de LipL32 (Stoddard et al., 2009).

## **Gen LipL32**

El gen que codifica para la proteína LipL32 tiene una longitud de 819 pares de bases, se localiza en el cromosoma I de todas las especies patógenas de leptospiras conocidas. Esta lipoproteína es el antígeno más ampliamente encontrado en el perfil proteico de las especies patógenas de leptospiras, representa alrededor de 40,000 copias/célula, tiene un peso molecular de 32 KDa, es altamente conservada entre las especies patógenas y no presenta homología con las especies saprofitas. Se ha demostrado su alta expresión durante infección in vitro y natural y es el blanco principal de la respuesta inmune. Esta lipoproteína es muy importante en el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad ya que funciona como la principal molécula de adhesión, induce la expresión de moléculas de la inflamación y está involucrada en la patogénesis de nefritis túbulo intersticial. Todo lo anterior, ubica a LipL32 como un excelente candidato para desarrollo de vacunas y pruebas de diagnóstico (Hauk et al., 2011; Hernández et al, 2015).

## **Validación**

Organizaciones internacionales como el Instituto de Normas Clínicas y Laboratorio (CLSI), así como Enmiendas en Mejora de Laboratorio Clínico (CLIA), trabajan en la búsqueda y mejora permanente de la calidad en los servicios de laboratorio clínico. También la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) y la Organización de Sanidad animal (OIE) trabajan en normas y directrices para el control de riesgos sanitarios y han elaborado una serie de manuales y guías para diseñar y ejecutar los procedimientos de validación de pruebas de diagnóstico en la cual se miden y evalúan los parámetros de control de calidad para una prueba determinada. Los parámetros más frecuentemente aplicados para la validación de pruebas de diagnóstico incluyen exactitud, precisión, rango de informe y sensibilidad analítica para obtener evidencia objetiva de que se cumplen con los requisitos de calidad especificados. Los protocolos de pruebas son ejecutados en fechas y horarios distintos y los resultados son posteriormente sometidos a una serie de pruebas estadísticas para garantizar que la prueba pueda usarse tal como fue diseñada para el propósito deseado. Esto con la finalidad de ayudar a la

industria de laboratorios a implementar métodos y técnicas diagnósticas que ofrezcan mayor confiabilidad, menor sesgo y menor variabilidad en los resultados de muestras clínicas y analíticas. El desarrollo e instrumentación de nuevos métodos de diagnóstico requiere que estos sean validados analíticamente para cumplir con las exigencias de calidad que las organizaciones reguladoras, dependencias de gobierno, la industria farmacéutica, laboratorios de diagnóstico y usuarios en general exigen. (Ahmed et al., 2009; Das et al., 2011; Burd et al., 2010; Jennings et al., 2009; Ramírez et al., 2015).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del área de estudio**

Los experimentos de validación se realizaron en la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) y en los laboratorios de Biología Celular y Bioquímica de la Unidad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en la ciudad de Mexicali, Baja California, México entre los meses de abril a junio 2017.

### **Muestras**

Para la validación de la plataforma RT-PCR de leptospira que amplifica un fragmento del gen que codifica para LipL32 se utilizaron 11 muestras adicionadas con ADN (spiked samples en inglés) provenientes del producto de PCR obtenido a partir de muestras que resultaron positivas al RT-PCR de LipL32 en un estudio previo. Los productos del PCR seleccionados para producir las muestras de validación analítica fueron diluidos para producir curvas de amplificación entre los 15 a 20 ciclos, 21 a 25 ciclos, 26 a 30 ciclos y 30 o más ciclos de 40 totales a los que fue programado el protocolo RT-PCR de LipL32 de validación (Cuadro 3). Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente muestras de ADN de cada grupo (cuartil) de ciclo de amplificación para los experimentos de validación analítica. Las muestras adicionadas con ADN son el tipo de espécimen ideal para estudios de validación analíticos ya que es posible controlar la cantidad de analito presente en la muestra matriz, de tal forma es posible cuantificar su recuperación (Ramírez et al., 2015). Además del ciclo de amplificación con distribución por cuartil, las muestras seleccionadas fueron aquellas cuyo producto de PCR alcanzará una temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 81°C y 83°C dado que la  $T_m$  del amplificado RT-PCR de LipL32 fue calculado en 82°C; asimismo, fueron seleccionadas solo muestras que produjeron >2,500 unidades relativas de fluorescencia (RFU) durante el análisis de curva de

disociación para garantizar la generación de curvas de amplificación altas y bien definidas.

**Cuadro 3.** Diluciones de ADN amplificado RT-PCR de LipL32 para producir muestras adicionadas.

Muestra	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4
1X pPCR 12-Mayo-2016	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
2X pPCR 12-Mayo-2016	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
3X pPCR 12-Mayo-2016	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
7X pPCR	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
1X pPCR	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
2X pPCR	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
3X pPCR	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O
7X pPCR	(1x) 5 µl pPCR + 995 µl H <sub>2</sub> O	(2x) 20 µl DNA 1x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(3x) 20 µl DNA 2x + 180 µl H <sub>2</sub> O	(4x) 20 µl DNA 3x + 180 µl H <sub>2</sub> O

### Diseño de Oligonucleótidos para LipL32

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína LipL32 de *Leptospira interrogans* serovariedad *Hardjo*, cepa RTCC2821 con número de acceso al *GenBank* JN886739.1. El gen corresponde a una molécula de ADN lineal de 806 pares de bases publicada en marzo de 2012. Se utilizó el programa Primer3Plus versión 2006-2007, que se encuentra disponible en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. A partir de la secuencia del gen LipL32 se generó el oligonucleótido denominado Lepto1F de banda positiva con secuencia 5'-TCGCTGAAATGGGAGTTCGT-3', mientras que para el oligonucleótido

denominado Lepto1R de banda negativa, la secuencia fue 3'-GCTTTGGCGATTTGGTCAGG-5'; una vez sometido al RT-PCR, la amplificación de esos oligonucleótidos genera un producto de 184 pares de bases. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Secuencias y características de los oligonucleótidos\* diseñados a partir del gen de LipL32 con referencia *GenBank* JN886739.1

<b>Oligonucleótido</b>		<b>Lepto1F</b>	
Secuencia:	TCGCTGAAATGGGAGTTCGT		
Inicio: 269	Longitud: 20 pb	Tm: 59.7 °C	GC: 50%
<b>Oligonucleótido:</b>		<b>Lepto1R</b>	
Secuencia:	GCTTTGGCGATTTGGTCAGG		
Inicio: 452	Longitud: 20 pb	Tm: 60.1°C	GC: 55%
<b>Producto:</b>	<b>184 pb</b>		

\*Se utilizó el programa *Primer3Plus* versión 2006-2007.

### Reconstitución de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por *GenScript LTD.* (Piscataway, NJ, USA), empacados y enviados liofilizados, los cuales fueron reconstituidos con agua grado biología molecular. Para la reconstitución, los tubos con el liofilizado fueron centrifugados a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó agua a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micro molar ( $\mu\text{M}$ ). Los tubos fueron mezclados en vortex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigerador a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente a máxima velocidad en vortex. Para las pruebas RT-PCR, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos fue establecida en 10  $\mu\text{M}$  para lo cual se hizo una dilución de la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular, produciendo cinco alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  cada una. Los oligonucleótidos fueron utilizados a una concentración de 400 nM, establecida en el estudio que antecede a este trabajo.

## Mezcla Maestra

En este trabajo se utilizó la mezcla maestra *2x Forget-Met-Not universal master mix* (Biotium, Inc. Fremont, CA), formulada con el fluoróforo EVA Green en una combinación de reactivos previamente optimizada en un volumen total de 10  $\mu$ l, la cual se muestra en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Reactivos y volumen de reacción para el RT-PCR de *Leptospira*

Reactivo	Oligonucleótidos a 400 nM
	1 reacción
Master Mix	5 $\mu$ l
DNA template	1 $\mu$ l
Primer 1- Forward	0.5 $\mu$ l
Primer 1-Reverse	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
Volumen final	10 $\mu$ l

\* El ADN template fue agregado al final en una campana de seguridad diferente

## Diseño del experimento de validación analítica

El protocolo de validación fue ejecutado durante 10 días de pruebas durante los cuales se realizaron 2 corridas diarias (matutina y vespertina), para un total de 20 repeticiones. Cada corrida incluyó las 11 muestras con ADN agregado seleccionadas y 24 controles negativos. Las muestras positivas conocidas y los controles negativos fueron ubicados de forma aleatoria en los 96 pozos del bloque del termociclador para cada una de las 20 corridas, obteniéndose 40 réplicas de cada muestra de amplicon LipL32 y un total de 440 observaciones. Los parámetros a evaluar fueron precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe, siguiendo los lineamientos que recomiendan la organización CLSI y las agencias federales CLIA y FDA en los Estados Unidos, para la validación analítica de nuevos métodos de diagnóstico clínico. (Ahmed et al., 2009; Das et al., 2011; Burd et al., 2010; Jennings et al., 2009; Ramírez et al., 2015). El límite de detección de ADN para el RT-PCR de LipL32 fue calculado amplificando diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  empleando un espectrómetro Jenway Genova

(<http://www.jenway.com/>), siguiendo las instrucciones que indica el manual del fabricante.

### **Pruebas RT-PCR**

Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados en el estudio previo y confirmados nuevamente en este trabajo empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR de 184 pb, el contenido de A, G, T y C de la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra, resultando en una programación con un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos que incluyeron 20 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación a 62.2°C y un ciclo final de extensión de 30 segundos a 72°C. Asimismo, se programó el análisis de curva de disociación a partir de 65°C y hasta 95°C para la identificación de curvas de amplificación dentro de la temperatura estimada de 82°C del producto amplificado del PCR de 184 pb y discriminar entre productos y artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN de LipL32 esperado.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados de las pruebas RT-PCR fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente obtuvo una señal fluorescente de amplificación antes del ciclo 40, por encima de la línea umbral de control que el programa CFX96 establece de manera automática y que corresponde a 10 veces la desviación estándar del promedio de índice de fluorescencia generada por todas las muestras durante los 10 primeros ciclos de cada corrida. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos

## Resultados

Los gráficos de amplificación y la curva de disociación generados por el software CFX96 de *BioRad* para la plataforma RT-PCR de LipL32 en este proyecto de validación analítica, confirmaron que la combinación óptima de reactivos para lograr la máxima amplificación en las muestras adicionadas con ADN se logró utilizando los oligonucleótidos Lepto1F y Lepto1R a una concentración en la mezcla de 400 nM con 1 µl de ADN template en un protocolo de temperatura que incluyó un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 60.2 °C y un ciclo final de extensión de 30 segundos a 72 °C. Bajo esta combinación de temperatura y tiempo de incubación las muestras positivas conocidas para *Leptospira* desarrollaron una señal por arriba de la línea umbral (Cq) y los controles negativos desarrollaron una señal por abajo de la línea umbral (Cq), considerando las pruebas como válidas. De igual forma, los resultados del análisis de la curva de disociación para las muestras adicionadas con ADN amplificaron dentro del rango esperado entre 81.0 °C y 83.0 °C, con una temperatura promedio de 81.84 °C obtenido por las 11 muestras en 20 corridas y un total de 440 observaciones.

Los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe de esta plataforma de RT-PCR para la detección de leptospirosis patógenas basada en la amplificación del gen LipL32 en muestras de sangre, se cumplieron satisfactoriamente.

Los resultados del parámetro precisión entre y dentro de las corridas para cada categoría del ciclo de amplificación demostraron alta repetibilidad y reproducibilidad al obtenerse una media de 18.58 con una desviación estándar total de 1.35 y un coeficiente de variación total de 7.3%, lo cual indica que entre y dentro de las 20 corridas se presentó una imprecisión menor a 2, (Anexos 1, 2

y 3). La precisión para la variable  $T_m$  (Temperatura de fusión) obtuvo un promedio de 81.84 con una desviación estándar total 0.31 y un coeficiente de variación total 0.4%, lo cual demuestra que las 11 muestras con sus 40 réplicas en un total de 440 observaciones se confirmaron positivas al amplificar con una temperatura de disociación dentro del rango 81.0°C a 83.0°C correspondiente al producto amplificado de 184 pb de LipL32; confirmando la alta repetibilidad y reproducibilidad de la prueba al presentar una imprecisión menor a 0.5, (Anexos 1, 2 y 3). Los resultados entre y dentro de los laboratorios produjeron una media de 81.85 con una desviación estándar de 0.304 y un coeficiente de variación total de 0.40, demostrando muy baja variabilidad entre y dentro corridas en un solo laboratorio como entre y dentro los dos laboratorios utilizados (Anexos 1 y 3), lo cual resulta concordante con los resultados dentro y entre corridas.

Los resultados del parámetro exactitud presentaron un sesgo de -0.06 para las 440 observaciones dado que la media fue de 81.84 y el valor óptimo medio de referencia es 82.0°C de acuerdo a la temperatura de disociación de producto amplificado de 184 pb de LipL32 (Anexo 4); lo cual demuestra estadísticamente (IC 95%) que el 100% de las réplicas estuvieron dentro del rango 81.0°C a 83.0°C de temperatura de fusión y establece el punto de corte entre muestras positivas y negativas. Asimismo, el parámetro de rango de informe se cumple al resultar el 100% de las muestras positivas (Anexo 4). En el Cuadro 6 se muestra un resumen detallado de los resultados del análisis estadístico del parámetro precisión mediante la prueba ANOVA, calculados en el software especializado en validaciones de laboratorio ANALYSE IT (<https://analyse-it.com/>). El límite de detección de la plataforma RT-PCR para LipL32 fue calculado aplicando la fórmula de Avogrado (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) y establecido en 10 equivalentes genómicos por reacción de 10  $\mu$ l en la dilución  $10^{-6}$  del ciclo 38.8, donde se obtuvo la última curva de amplificación positiva en los experimentos de diluciones seriadas.

**Cuadro 6.** Resultados del parámetro precisión del RT-PCR para LipL32

<b>Experimento con IC 95%</b>	<b>Promedio</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
Dentro corrida Cq	18.58	1.31	7.10%
Entre corrida Cq		0.31	1.70%
Dentro corrida Tm	81.84	0.27	0.30%
Entre corridas Tm		0.12	0.10%
Dentro laboratorio Cq	18.56	1.91	6.40%
Entre laboratorios Cq		0	0%
Dentro de laboratorio Tm	81.85	0.29	0.40%
Entre de laboratorio Tm		0.09	0.10%

## DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene como objetivo la validación analítica de una plataforma RT-PCR que utiliza un juego de oligonucleótidos que detectan y amplifican un fragmento de ADN del gen que codifica para la proteína de fusión conocida como LipL32, la cual solo es expresada por leptospiras de cepas patógenas. La validación analítica de la plataforma RT-PCR de LipL32 fue instrumentada en un termociclador a tiempo real y paquetería CFX96 de Bio Rad que utiliza una mezcla maestra compuesta por el fluoróforo *EvaGreen*, un colorante fluorescente de alta afinidad con el ADN de doble banda que es completamente inocuo para el operador de laboratorio o para el medio ambiente; resultando en una plataforma de diagnóstico molecular altamente sensible y específica para la detección de leptospiras patógenas a partir de muestras de sangre.

La validación analítica de la plataforma RT-PCR de LipL32 surge como respuesta a necesidad de herramientas de diagnóstico confiable, precisa y rápida para detectar una enfermedad como la leptospirosis, donde los signos y síntomas de la enfermedad por si solos no proporcionan evidencia suficiente para declarar la enfermedad o donde el cultivo microbiológico toma demasiado tiempo para producir un resultado positivo, ocasionando en ambos caso retrasos en la iniciación de la terapia con antibióticos y repercutiendo en el tiempo requerido para recuperar el estado de salud (Doungchawee et al., 2017; Gökmen et al., 2016, Xu et al., 2014).

El diagnóstico molecular de la leptospirosis basada en la amplificación del gen que codifica para la proteína de fusión LipL32 ha sido probado y documentado desde principio de la década pasada, en dichos estudios se resalta la característica de que dicho gen y la proteína correspondiente solo está presente y es expresada por las distintas especies patógenas de leptospiras conocidas hasta la fecha (Ahmed et al., 2009; Stoddard et al., 2009, Xu et al., 2014). A pesar de las ventajas técnicas que resultan del desarrollo de plataformas de diagnóstico

molecular para la detección y diagnóstico de leptospiras patógenas de forma rápida, sensible y específica, en la actualidad no se cuenta con reportes de validación analítica para ninguno de los procedimientos publicados, de tal forma que a pesar del gran valor tecnológico que significa el contar con los protocolos de diagnóstico molecular que funcionan eficientemente, ninguno de ellos ha sido sometido a pruebas estandarizadas de validación analítica para evaluar y medir los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe que permita lograr altos niveles de repetibilidad y reproducibilidad de los resultados de esas pruebas y garanticen la confiabilidad de los resultados independientemente del laboratorio donde se estén realizando las pruebas.

El procedimiento de validación de la plataforma RT-PCR para LipL32 reportada en este trabajo fue diseñado y ejecutado siguiendo las recomendaciones y procedimientos de tres importantes organizaciones dedicadas a crear y evaluar normas de calidad, seguridad y eficiencia para las distintas disciplinas de salud humana y animal. La primera de ellas es el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute* o CLSI por sus siglas en inglés) con sede en Filadelfia, en los Estados Unidos de América. El CLSI fue fundado en 1968 y desde entonces se dedica a crear y mejorar normas y directrices para profesionales de las áreas de la salud en búsqueda de mejorar los niveles de calidad, seguridad y eficiencia de las pruebas de laboratorio. El CLSI es un organismo acreditado por el Instituto Nacional Norteamericano de Estándares (*American National Standards Institute* o ANSI por sus siglas en inglés); el CLSI es también sede del Sistema Nacional de Referencia para Laboratorios Clínicos (*National Reference System for the Clinical Laboratory* o NRSL por sus siglas en inglés), el CLSI es un grupo dedicado mejorar la comparabilidad de los resultados de las pruebas de laboratorio, de acuerdo con las necesidades de la medicina humana o veterinaria. Las normas y directrices del CLSI están disponibles en <http://clsi.org/>. La segunda organización es el Centro de Control de Enfermedades (*Centers for Disease Control* o CDC por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América, a través del programa de Enmiendas de Mejora para el Laboratorio Clínico (*Clinical Laboratory Improvement Amendments* o CLIA por sus siglas en inglés), donde se establecen las normas de calidad para las pruebas de laboratorio que se practican en especímenes de seres

humanos tales como sangre, fluidos corporales y tejidos con fines de diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades. Asimismo, el CDC/CLIA proporciona asistencia técnica para el análisis, investigación y elaboración de normas técnicas y directrices para diseño e instrumentación de protocolos, mejoramiento de la calidad de los servicios y buenas prácticas de laboratorio. Las normas y directrices del CDC/CLIA están disponibles en <https://wwwn.cdc.gov/clia/>. Finalmente, se siguieron las recomendaciones del Capítulo 1.1.6 Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas, versión actualizada 2013 del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Las normas y directrices de la OIE están disponibles en la <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>.

Cada una de esas organizaciones han desarrollado por separado un apartado que contiene una serie de normas y directrices de aseguramiento de la calidad en pruebas diagnósticas de nueva creación para garantizar los resultados de las nuevas metodologías de diagnóstico aplicadas a pacientes humanos o animales que generen resultados rápidos y confiables, con altos niveles de sensibilidad y especificidad, pero buscando además altos niveles de reproducibilidad y repetibilidad de las nuevas plataformas, permitiendo que el clínico humano o animal llegue a establecer un diagnóstico más certero y confiable para sus pacientes.

Este conjunto de normas y directrices se fundamentan en la validación analítica de las nuevas plataformas diagnósticas que constantemente se están desarrollando por todo el mundo y que en términos generales buscan mejorar el desempeño analítico y costo de las pruebas ya existentes, pero manteniendo o mejorando los niveles de calidad y confiabilidad. La validación se fundamenta en la aplicación de una serie de parámetros de calidad que las nuevas plataformas de diagnóstico deben cumplir, tales como la precisión, la cual mide el error aleatorio, la exactitud que mide el sesgo, la sensibilidad analítica que mide el límite de detección y permite establecer la cantidad mínima detectable de una proteína o equivalente genómico, el rango de informe que permite establecer la amplitud

de valores que la prueba es capaz de detectar en una muestra positiva (Burd et al., 2010, Das et., 2011, Jennings et al., 2009).

Los experimentos de validación de la plataforma RT-PCR para LipL32 que aquí se presentan demostraron un alto nivel de precisión (IC 95%) y robustez en las pruebas, tal y como se observa en los resultados del análisis de la curva de disociación ( $T_m$ ), la cual se basa en incrementos de temperatura hasta llegar al punto exacto donde un fragmento de ADN de doble banda se funde y separa en bandas de ADN sencillas. En la plataforma RT-PCR para LipL32 se diseñó un fragmento de amplificación de 184 pb con un contenido de GC de 49% y una temperatura de fusión entre  $81^{\circ}\text{C}$  y  $83^{\circ}\text{C}$ ; de tal forma que es posible discriminar entre los productos de PCR de longitud, contenido de GC y  $T_m$  de LipL32 de otros productos o artefactos del PCR que fueron capaces de hibridarse con los oligonucleótidos, amplificarse y generar curvas de fluorescencia pero que por tener una longitud y contenido de GC distinto a LipL32 producen curvas de disociación de temperatura diferente a la calculada para la plataforma RT-PCR de LipL32. En ese sentido, al aplicar el parámetro  $T_m$  para discriminar que el resultado de una muestra particular sea positivo o negativo, la repetibilidad y reproducibilidad dentro de las corridas y entre las corridas de la plataforma RT-PCR de LipL32 fue  $>99.5\%$  con una desviación estándar de 0.30 y un coeficiente de variación total de 0.4% ( $p < 0.0001$ ); parámetros que garantizan alta precisión con una variabilidad mínima para determinar cuándo una muestra generó un resultado positivo o negativo dentro de una corrida particular realizada durante la mañana, de las corridas realizadas más tarde durante ese día o corridas realizadas en días subsecuentes bajo las mismas condiciones. Asimismo, cuando se analiza la variable ciclo de amplificación ( $C_q$ ) que detecta el ciclo específico al que una muestra con una cantidad de ADN determinada produce una señal de amplificación y fluorescencia que la define como positiva o negativa, demostró una repetibilidad y reproducibilidad  $>98\%$  y coeficiente de variación total de 7.3% ( $p < 0.0001$ ) dentro de una corrida particular realizada durante la mañana, de las corridas realizadas más tarde durante ese día o corridas realizadas en días subsecuentes bajo las mismas condiciones; lo que significa que la plataforma RT-PCR de LipL32 genera resultados altamente precisos a distintas concentraciones de ADN inicial en las muestras

EL parámetro exactitud de la plataforma RT-PCR de LipL32 tuvo un promedio para  $T_m$  de 81.84 °C con un sesgo de -0.06 en 440 observaciones ( $p < 0.0001$ ) para el rango establecido de 81.0 C° a 83.0 °C, lo cual demuestra un nivel de exactitud >99% a través de todo el experimento considerando 11 muestras duplicadas en posición aleatoria dentro del bloque del termociclador en 2 corridas independientes por día durante 10 días y utilizando 2 termocicladores distintos en 2 laboratorios independientes. La evaluación de los resultados de las corridas dentro laboratorio y entre laboratorios se realizó comparando los resultados obtenidos de la corrida número 1 ejecutada en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Ciencias de la Salud en un termociclador Bio-Rad modelo c1000-Touch con los resultados obtenidos de la corrida número 12 efectuado en el Laboratorio de Bioquímica de la misma Unidad utilizando un termociclador Bio Rad modelo CFX Connect; demostrando altos niveles de repetibilidad, reproducibilidad y robustez de la prueba dentro y entre distintos laboratorios utilizando distintos termocicladores en dos laboratorios distintos. Al aplicar este diseño de pruebas, corridas y número de muestras, se duplicaron los requerimientos mínimos que las principales organizaciones e instituciones internacionales como el CLSI, el CDC/CLIA y la OIE recomiendan para evaluar la precisión y exactitud de nuevas pruebas de diagnóstico sujetas a proceso de validación (Burd et al., 2010, Das et., 2011; Jennings et al., 2009).

El límite de detección de la plataforma RT-PCR de LipL32 fue estimado en 10 equivalentes genómicos por reacción de 10  $\mu$ l, obtenidos a través de la medición de la concentración en ng/ $\mu$ l de ADN en muestras que lograron un  $C_q \geq 38$ , es decir, que lograron producir una curva de amplificación después del ciclo 38/40 y posteriormente aplicando la fórmula de Avogrado, la cual se basa en que el peso molecular promedio de un par de bases es de 650 Daltons, lo que significa que un Mol de un par de bases pesa 650 g y el peso molecular de cualquier fragmento de ADN de doble banda puede estimarse tomando el producto de su longitud en pares de bases y multiplicarlo 650. Partiendo de ese concepto se puede utilizar la fórmula de Avogadro:  $6.022 \times 10^{23}$  moléculas/mol y se puede calcular el número de moléculas de ADN por gramo. El número final de copias de ADN presentes en la muestra se calcula multiplicando por  $1 \times 10^9$  para convertir a

ng y luego multiplicando por la cantidad de ADN por ng de la muestra. El límite de detección de 10 equivalentes genómicos por reacción corresponde a lo reportado por otros autores 8-10 Eg (Ahmed et al., 2009; Ferreira et al., 2014; Levet et al., 2005). El límite de detección logrado por la plataforma RT-PCR de LipL32 coincide con lo establecido por la compañía Bio-Rad como límite de detección del sistema óptico CFX integrado a sus termocicladores.

Finalmente, se concluye que la plataforma RT-PCR de LipL32 fue exitosamente validada al probar un número suficiente de muestra, un número de repeticiones que duplica el mínimo requerido por organizaciones internacionales dedicadas al control de calidad y que los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad analítica y rango de informe resultan en una plataforma robusta y confiable para ser aplicada en el diagnóstico molecular de leptospirosis en muestras de sangre de perros. Cabe mencionar que esta plataforma de diagnóstico molecular puede funcionar como base metodológica para su aplicación en muestras procedentes de otras especies animales e incluso, muestras de pacientes humanos, previa adaptación y validación analítica. Asimismo, los protocolos y rutas críticas de laboratorio pueden ser adaptados y aplicados para el proceso de validación de plataformas de diagnóstico molecular por RT-PCR para otras enfermedades infecciosas que afectan a las poblaciones humanas o animales y que no se encuentran disponibles en nuestro medio o que por las dificultades inherentes a su aislamiento por técnicas de microbiología, hacen del diagnóstico molecular la opción más viable para responder a las necesidades de diagnóstico actuales.

## LITERATURA CITADA

Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. 2004. Epidemiología y Diagnóstico de la Leptospirosis como Fundamento para el Diseño de Estrategias de Control. Revista Digital CENIAP HOY Número 6. Maracay, Aragua, Venezuela. URL: [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaroc/arti/alfaroc.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaroc/arti/alfaroc.htm)

Ahmed, Ahmed, Mirjam F. M. Engelberts, Kimberly R. Boer, Niyaz Ahmed, and Rudy A. Hartskeerl. 2009. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. PLoS ONE 4(9).

Azócar-Aedo, L., H. L. Smits, and G. Monti. 2014. Leptospirosis in Dogs and Cats: Epidemiology, Clinical Disease, Zoonotic Implications and Prevention. Archivos de Medicina Veterinaria 46(3), 337–48.

Burd, Eileen M. 2010. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews 23 (3), 550–76.

Chen, H.-W., Zhang, Z., Halsey, E. S., Guevara, C., Canal, E., Hall, E. Ching, W.-M. 2013. Detection of *Leptospira*-Specific Antibodies Using a Recombinant Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 89(6), 1088–1094.

Chirathaworn, C., Chantaramalai, T., Sereemasapun, A., Kongthong, N., & Suwancharoen, D. 2011. Detection of *Leptospira* in urine using anti-*Leptospira*-coated gold nanoparticles. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 34(1), 31–34.

Cinco, M. 2010. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. The New Microbiologica, 33(4), 283–29

Cisneros Puebla, M. Á., Moles Cervantes, L. P., Gavaldón Rosas, D., Rojas Serranía, N., & Torres Barranca, J. I. 2002. Serología diagnóstica de Leptospirosis Porcina en México 1995-2000. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(1), 28–31.

Costa, Federico, José E. Hagan, Juan Calcagno, Michael Kane, Paul Torgerson, Martha S. Martinez-Silveira, Claudia Stein, Bernadette Abela-Ridder, and Albert I. Ko. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (9).

Cullen P.A., Haake D.A., Adler B., 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes, *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (2004), pp. 291 –318.

Cullen P.A., Xu X., Matsunaga J., Sanchez Y., Ko A.I., Haake D.A., Adler B., 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp, *Infection and Immunity*, 73, pp. 4853 –4863.

Das, Barnali. 2011. Validation Protocol: First Step of a Lean-Total Quality Management Principle in a New Laboratory Set-up in a Tertiary Care Hospital in India. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 26 (3), 235–43.

Doungchawee, Galayanee, Direk Sutdan, Kannika Niwatayakul, Tasanee Inwisai, Athisri Sitthipunya, Naphatsawan Boonsathorn, Titipatima Sakulterdkiat, Worachart Sirawaraporn, and Visith Thongboonkerd. 2017. Development and Evaluation of an Immunochromatographic Assay to Detect Serum Anti-Leptospiral Lipopolysaccharide IgM in Acute Leptospirosis. *Scientific Reports* 7.

Ehsanollah, S., & Gholam, R. A. pour. 2011. Detection of leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in north-east of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 227–229.

FDA Guidance for Industry–Bioanalytical Method Validation guidelines, 2015. URL:

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

Ferreira, Ana Sofia, Pedro Costa, Teresa Rocha, Ana Amaro, Maria Luísa Vieira, Ahmed Ahmed, Gertrude Thompson, Rudy A. Hartskeerl, and João Inácio. 2014. Direct Detection and Differentiation of Pathogenic *Leptospira* Species Using a Multi-Gene Targeted Real Time PCR Approach. *PLoS ONE* 9 (11).

Fraga, T. R., Barbosa, A. S., & Isaac, L. 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Complement System. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(5), 408–419.

Fraga, T. R., Courrol, D. dos S., Castiblanco-Valencia, M. M., Hirata, I. Y., Vasconcellos, S. A., Juliano, L. Isaac. (2014). Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. *Journal of Infectious Diseases*, 209(6), 876–886.

Gökmen, Tülin Güven, Ayben Soyal, Yıldız Kalayci, Cansu Önlü, and Fatih Köksal. 2016. Comparison of 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR and OmpL1-PCR Methods in the Diagnosis of Leptospirosis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58.

González, Sabina, Juan Pablo Geymonat, Elba Hernández, Juan Martín Marqués, Felipe Schelotto, and Gustavo Varela. 2013. Usefulness of Real-Time PCR Assay Targeting lipL32 Gene for Diagnosis of Human Leptospirosis in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries* 7 (12): 941–45.

Haake, D. A., & Levett, P. N. 2015. Leptospirosis in Humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 65–97.

Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M., & Ellis, W. A. (2011). Emergence, control and re-emerging Leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 494–501.

Hauk, P., Macedo, F., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., Morais, Z. M. de, Barbosa, A. S., & Ho, P. L. (2008). In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin Infection and Immunity, 76(6), 2642–2650.

Hernández-Rodríguez, Patricia, Mónica Baquero P, Andrés Felipe Santander Torres, and Arlen Gómez. 2015. Diversidad molecular de candidatos vacunales en *Leptospira* spp. *Revista Medicina Veterinaria* (30), 95–106

Jin, D., Ojcius, D. M., Sun, D., Dong, H., Luo, Y., Mao, Y., & Yan, J. 2009. *Leptospira interrogans* Induces Apoptosis in Macrophages via Caspase-8- and Caspase-3-Dependent Pathways. *Infection and Immunity*, 77(2), 799–809.

Jennings, Lawrence, Vivianna M. Van Deerlin, and Margaret L. Gulley. 2009. Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133 (5), 743–55.

Levett, Paul N, Roger E Morey, Renee L Galloway, Danielle E Turner, Arnold G Steigerwalt, and Leonard W Mayer. 2005. Detection of Pathogenic Leptospire by Real-Time Quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology* 54 (1), 45–49.

Lucheis, S. B., & Ferreira Jr., R. S. 2011. Ovine leptospirosis in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(4), 394–405.

Luna, M.A. Socci, E.G., Luna, R.E.M., Felix, S.G. 2015. Leptospirosis en las regiones ecológicas ganaderas de México. *Revista digital BM Editores*. URL: <http://bmeditores.mx/leptospirosis-bovina-en-las-regiones-ecologico-ganaderas-mexico>

Marinho, M., & Cardoso, T. C. 2014. Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues. *J Med Microb Diagn*, 4(1), 127-128.

Monahan, A. M., Callanan, J. J., & Nally, J. E. 2009. Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Veterinary Pathology Online*, 46(5), 792–799.

Moreno, Natali, and Piedad Agudelo-Flórez. 2010. Aplicación de Las Pruebas de PCR Convencional Simple Y Múltiple Para La Identificación de Aislamientos de *Leptospira Spp.* En Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública* 27 (4), 548–56.

Murray, Gerald L. 2013. The Lipoprotein LipL32, an Enigma of Leptospiral Biology. *Veterinary Microbiology* 162(2-4), 305–14.

Organización Mundial de la Salud, 2008. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 127p.: il. (Serie de Manuales Técnicos, 12). ISSN 0101-6970 1.

Pfaffl, Michael W. 2010. Methods. The ongoing Evolution of qPCR, 50 (4), 215–16.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4), 351–357.

Petrakovsky, Jessica, Alejandra Bianchi, Helen Fisun, Patricia Nájera Aguilar, and Martha Maria Pereira. 2014. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11(10), 10770–89.

Picardeau, Mathieu. 2017. Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita?. *Nature Reviews Microbiology* 15 (5), 297–307.

Quinn, P. J, F.C. Markey, E.S. FitzPatrick, S. Fanning., & P.J. Hartigan.

2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (2nd Ed.). John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, UK.

Ramírez, Juan Carlos, Carolina Inés Cura, Otacilio da Cruz Moreira, Eliane Lages-Silva, Natalia Juiz, Elsa Velázquez, Juan David Ramírez, et al. 2015. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma Cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD17* (5), 605–15.

Rivera, F. A, R., De La Pena, A., Roa, R. M. A., & Ordoñez. B. M. L. 1999. Seroprevalencia de Leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. *Veterinaria México*. 30(1), 105-107.

Stoddard, Robyn A., Jay E. Gee, Patricia P. Wilkins, Karen McCaustland, and Alex R. Hoffmaster. 2009. Detection of Pathogenic *Leptospira* Spp. through TaqMan Polymerase Chain Reaction Targeting the LipL32 Gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64(3):247–55.

Secretaria de salud. 2017. Manual de Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis, 1 (34), 1. URL: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>

Sykes, J., Hartmann, K., Lunn, K., Moore, G., Stoddard, R., & Goldstein, R. 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 1–13.

Tilahun, D. R. Z. 2013. Global Epidemiological Overview of Leptospirosis, 4(1), 9–15.

Vieira M.L., Fernandes L.G., Domingos R.F., Oliveira R., Siqueira R.H., Souza N.M., Teixeira A.R.F., Atzingen M.V. y Nascimento A.L.T.O., 2013. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions. *FEMS Microbiol Lett*, 352, 129-139.

Villumsen S., Pedersen R., Binderup B.M., Ahrens P., Skov J.J., Krogfelt K.A., 2012. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 184–190.

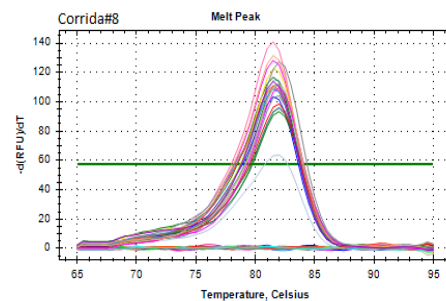
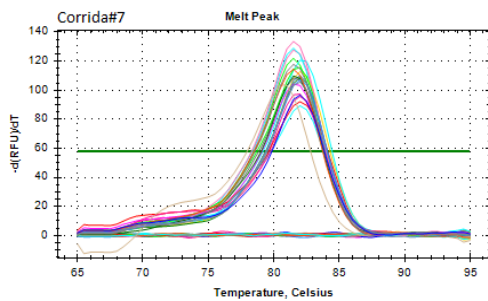
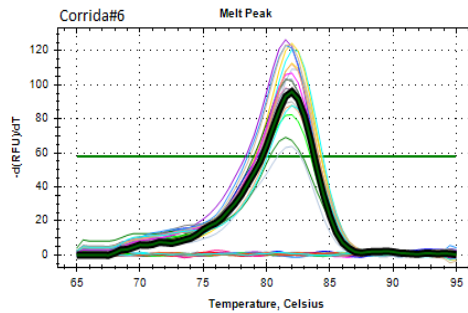
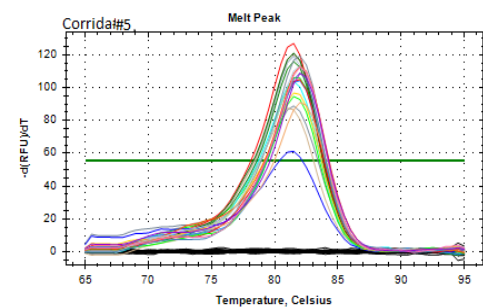
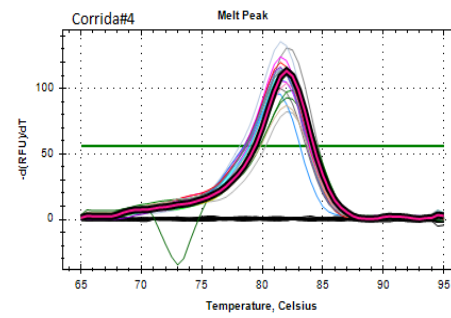
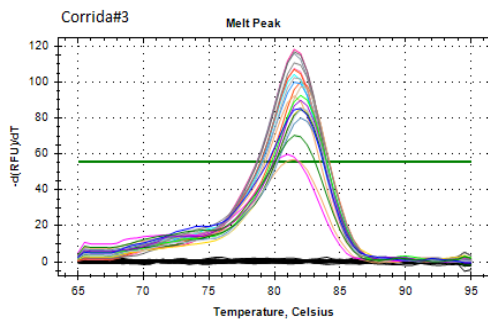
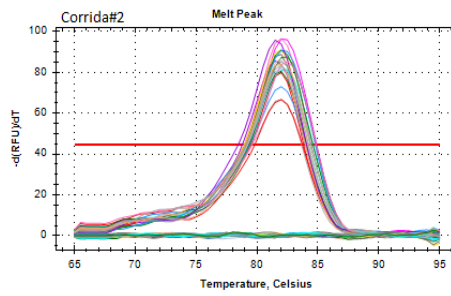
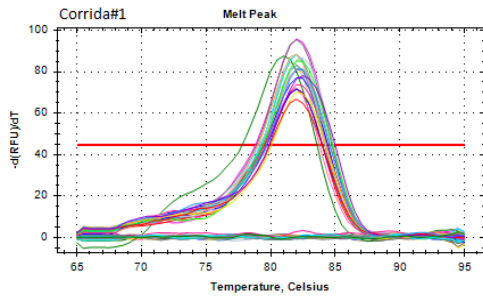
Waggoner, Jesse J. et al. 2014. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic *Leptospira* Spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. *PLoS ONE* 9(11).

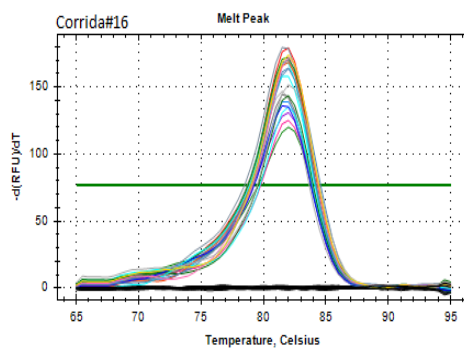
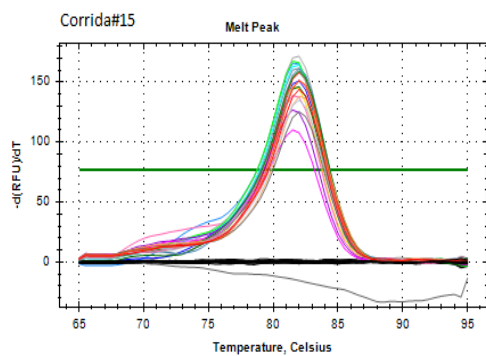
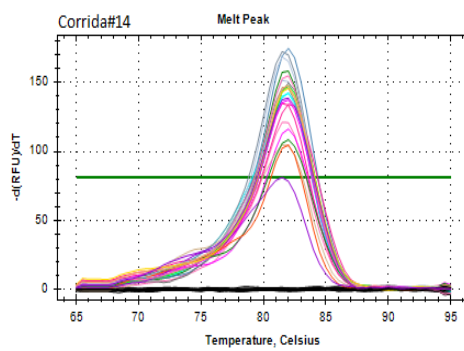
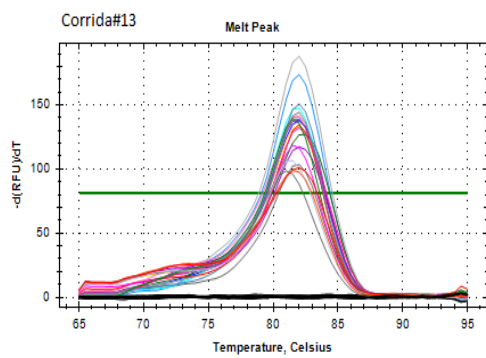
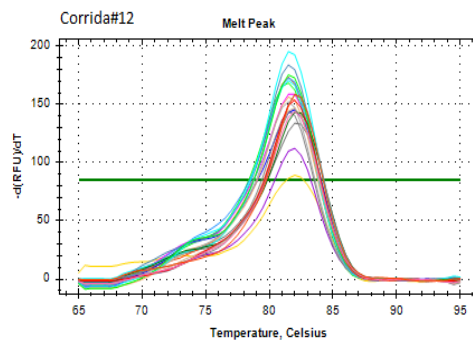
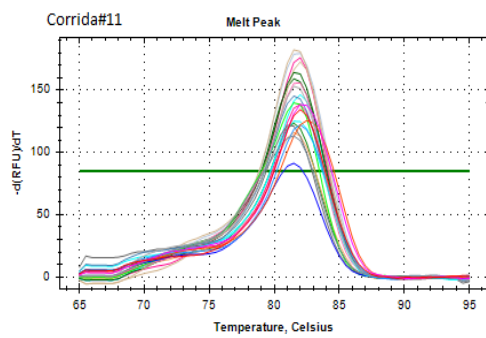
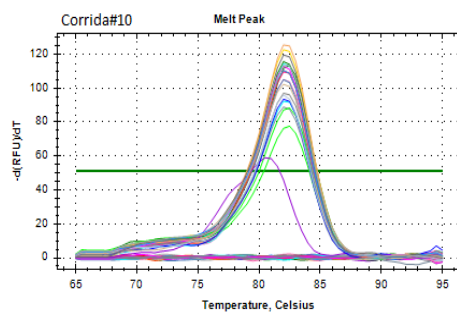
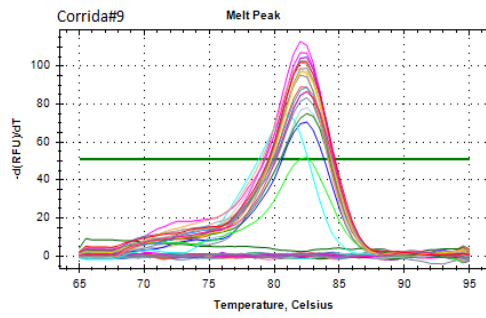
White, Allison M., Carlos Zambrana-Torrel, Toph Allen, Melinda K. Rostal, Andrea K. Wright, Eileen C. Ball, Peter Daszak, and William B. Karesh. 2017. Hotspots of Canine Leptospirosis in the United States of America. *The Veterinary Journal*, 222, 29–35.

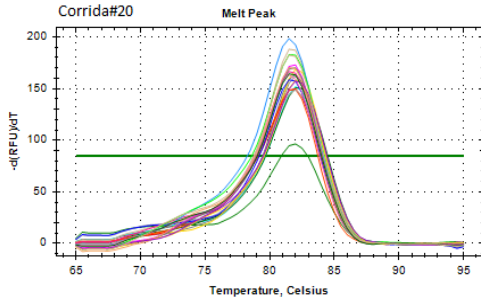
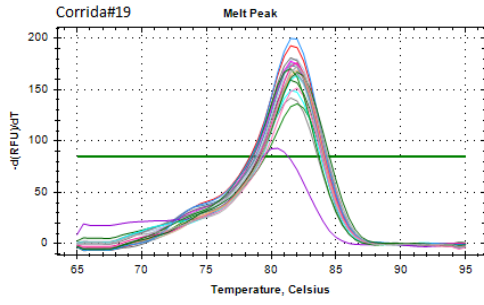
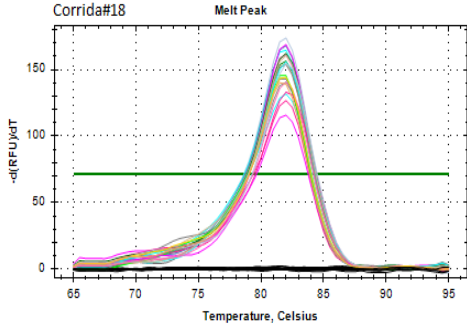
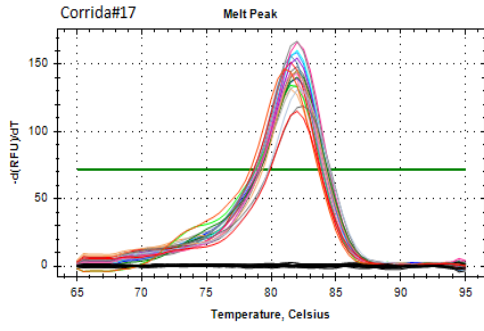
Xu, C., Loftis, A., Ahluwalia, S. K., Gao, D., Verma, A., Wang, C., & Kaltenboeck, B. 2014. Diagnosis of Canine Leptospirosis by a Highly Sensitive FRET-PCR Targeting the *lig* Genes. *PLoS ONE*, 9(2).

# ANEXOS

## Anexo 1. Graficas de curva de fusión del RT-PCR de LipL32







## Anexo 2. Resultados entre y dentro corridas del RT-PCR de LipL32

Muestra	Corrida	Mt	Cq
5	1	82	18.13304
5	1	82.5	17.16315
7	1	82	19.4345
7	1	82	19.22009
1	1	82	18.10152
1	1	82	18.17197
8	1	82.5	16.67933
8	1	82	17.29344
3	1	82	20.33679
3	1	81.5	20.98977
2	1	82	19.90863
2	1	81.5	19.8027
10	1	82	19.328
10	1	82	19.41056
11	1	82	18.16705
11	1	82	17.59312
6	1	82	17.68274
6	1	82	17.57847
9	1	81	18.14956
9	1	82	18.00609
12	1	81.5	18.32924
12	1	82	17.71324

Muestra	Corrida	Mt	Cq
2	2	82	19.05144
2	2	81.5	19.62859
5	2	82.5	17.03836
5	2	82	17.51924
9	2	81.5	18.09871
9	2	82	17.62784
1	2	82	16.46496
1	2	82.5	17.14818
8	2	82	18.53021
8	2	82	18.49756
11	2	82	18.07138
11	2	81.5	18.19294
7	2	82	17.91
7	2	82	16.2552
10	2	82	19.25003
10	2	82	19.19491
3	2	82	20.32774
3	2	82	20.3221
12	2	81.5	17.23448
12	2	82.5	16.21352
6	2	82.5	17.28999
6	2	82	18.05355

Muestra	Corrida	Mt	Cq
10	3	81.5	19.8573
10	3	82	18.07151
3	3	82	22.34003
3	3	82	20.26616
6	3	82	19.08281
6	3	82	19.03911
11	3	81.5	18.59527
11	3	81.5	18.92952
1	3	82	18.27799
1	3	81	18.60726
2	3	82	20.42366
2	3	82	19.91608
7	3	81.5	19.14477
7	3	81.5	19.26833
9	3	81.5	18.55558
9	3	81.5	19.23744
8	3	81.5	18.41634
8	3	81.5	18.51397
12	3	81.5	18.5044
12	3	81.5	18.79562
5	3	82	18.61824
5	3	81.5	17.79087

6	4	82	19.31048
6	4	82	18.66047
7	4	81.5	19.27407
7	4	81.5	16.33102
2	4	82	20.29609
2	4	82	21.14592
11	4	81.5	18.11586
11	4	81.5	18.95026
5	4	82	18.1503
5	4	82	19.18106
1	4	82.5	17.62739
1	4	82	17.88872
10	4	81	19.40998
10	4	81.5	18.14134
12	4	81.5	18.98853
12	4	81.5	16.46914
9	4	81.5	18.16292
9	4	81.5	18.31637
8	4	81.5	18.20019
8	4	81.5	18.1669
3	4	82	20.17935
3	4	82	22.01433

3	5	82	20.33891
3	5	82	21.17096
2	5	82	20.31803
2	5	82	19.03405
1	5	82	18.1394
1	5	82	18.00651
5	5	81.5	18.2574
5	5	82	18.58676
10	5	81.5	19.06629
10	5	81.5	20.40572
6	5	82	19.21326
6	5	82	19.42695
8	5	81.5	18.84356
8	5	81	18.25828
9	5	81.5	18.50531
9	5	81.5	19.05975
11	5	81.5	19.07991
11	5	81.5	18.58773
12	5	81.5	18.36984
12	5	81.5	17.05592
7	5	81.5	18.32677
7	5	81.5	19.67371

6	6	82	18.36437
6	6	82	18.36294
1	6	82	17.95874
1	6	82	17.31709
7	6	82	18.47825
7	6	82	18.24913
12	6	81.5	18.01264
12	6	81.5	16.97151
8	6	81.5	18.24377
8	6	81.5	17.30132
9	6	82	17.20413
9	6	81.5	19.23093
10	6	82	20.15526
10	6	82	17.75852
11	6	81.5	17.84097
11	6	81.5	16.80003
3	6	82	19.49907
3	6	82	19.76463
5	6	82	17.7416
5	6	82	18.35892
2	6	82	18.47555
2	6	82	19.65531

6	7	82	18.08158
6	7	82	19.39235
8	7	81.5	17.60246
8	7	81.5	17.06825
3	7	82	19.7646
3	7	82	21.05904
9	7	81.5	18.3564
9	7	81.5	18.1434
5	7	82	17.16534
5	7	82	17.27035
10	7	82	18.62873
10	7	82	16.42825
11	7	81.5	17.40436
11	7	81.5	17.31649
2	7	82	19.29934
2	7	82	18.93217
1	7	82	17.47392
1	7	82	17.32765
2	7	81.5	17.4644
12	7	81.5	17.9419
7	7	81.5	19.03229
7	7	82	19.5245

8	8	81.5	18.1347
8	8	81.5	18.0348
2	8	82	18.9726
2	8	82	19.1298
1	8	82	17.3453
1	8	82	16.8062
6	8	82	18.1586
6	8	82	18.7887
5	8	82	17.7389
5	8	82	18.1813
12	8	81.5	18.0027
12	8	81.5	16.8279
3	8	82	20.2553
3	8	82	19.8428
10	8	81.5	18.3117
10	8	81.5	17.8295
11	8	81.5	17.2498
11	8	81.5	18.2537
9	8	81.5	17.2287
9	8	81.5	18.0403
7	8	82	19.0307
7	8	82	19.0539

82	9	82	17.32746
82.5	9	82.5	17.04962
82.5	9	82.5	18.58633
82	9	82	19.24317
82	9	82	17.66006
82.5	9	82.5	17.92031
82.5	9	82.5	16.77235
82	9	82	17.21999
82.5	9	82.5	18.0689
82	9	82	20.749
82.5	9	82.5	18.20564
82.5	9	82.5	19.64342
82.5	9	82.5	17.62515
82.5	9	82.5	17.3538
81	9	81	19.08772
82	9	82	17.10842
82	9	82	18.15088
82.5	9	82.5	17.42247
81.5	9	81.5	18.88996
82	9	82	16.64423
82.5	9	82.5	17.05098
82.5	9	82.5	18.42333

Muestra	Corrida	Mt	Cq
7	10	82.5	18.00892
7	10	82	18.56303
1	10	82	17.24885
1	10	82	17.64595
12	10	82	18.09461
12	10	82	17.57607
6	10	82	18.24954
6	10	82	17.81553
2	10	82	19.93001
2	10	81.5	19.80227
8	10	82.5	17.81364
8	10	82	18.1768
10	10	82	18.27897
10	10	82	17.83616
3	10	82	20.10068
3	10	82	19.46256
11	10	82	18.45708
11	10	82	17.76209
5	10	82	17.79798
5	10	82	17.24685
9	10	82.5	17.604
9	10	82.5	18.52282

Muestra	Corrida	Mt	Cq
5	11	82	18.29629
5	11	82	17.63653
7	11	81.5	20.89613
7	11	81.5	19.23364
1	11	82.5	17.06891
1	11	82	18.62907
8	11	81.5	18.37547
8	11	81.5	18.00009
3	11	81.5	20.00341
3	11	81	20.82895
2	11	81.5	20.43183
2	11	82	20.77378
10	11	81.5	20.10309
10	11	82	19.4646
11	11	81.5	18.26677
11	11	81.5	18.48902
6	11	82	18.86518
6	11	82	19.55745
9	11	81.5	19.22837
9	11	81.5	18.75744
12	11	81.5	18.67116
12	11	82	18.32954

Muestra	Corrida	Mt	Cq
2	12	82	19.59972
2	12	82	19.39025
5	12	82	17.77807
5	12	82	18.17769
9	12	81.5	19.23682
9	12	81.5	18.25786
1	12	82	17.8916
1	12	82	16.98806
8	12	81.5	18.62674
8	12	81.5	18.00351
11	12	81.5	18.87315
11	12	81.5	17.69697
7	12	81.5	19.6792
7	12	81.5	18.3936
10	12	82	17.50117
10	12	82	19.52656
3	12	82	17.51677
3	12	82	21.0515
12	12	81.5	17.07539
12	12	81.5	17.81672
6	12	82	18.62848
6	12	82	22.10472

10	13	82	19.25895
10	13	81.5	19.2761
3	13	81.5	21.11531
3	13	81.5	21.15635
6	13	81.5	18.61287
6	13	82	18.6276
11	13	82	17.99973
11	13	81.5	18.0234
1	13	81.5	18.04118
1	13	82	16.96275
2	13	82	19.4469
2	13	82	19.56994
7	13	82	18.13897
7	13	82	18.47885
9	13	82	18.41373
9	13	81.5	19.06456
8	13	82	17.37273
8	13	82	17.44769
12	13	82	17.94213
12	13	81.5	17.64551
5	13	82	17.87966
5	13	81.5	17.59531

6	14	82	18.74912
6	14	82	18.42996
7	14	81.5	18.54791
7	14	82	18.22343
2	14	81.5	31.14272
2	14	82	30.89354
11	14	82	18.74366
11	14	81.5	17.99421
5	14	82	17.18148
5	14	81.5	17.45059
1	14	82	18.14478
1	14	82	18.06764
10	14	81.5	19.06573
10	14	82	19.86512
12	14	81.5	18.29622
12	14	81.5	18.42704
9	14	82	18.44054
9	14	82	18.6323
8	14	81.5	18.48313
8	14	82	18.80984
3	14	82	20.89581
3	14	81.5	20.43191

3	15	82	20.47103
3	15	82	19.52923
2	15	82	19.58882
2	15	82	19.95028
1	15	82	17.82856
1	15	82	17.67278
5	15	82	17.81723
5	15	82	19.0899
10	15	81.5	18.84785
10	15	81.5	19.45486
6	15	82	18.41472
6	15	82	18.04889
8	15	82	18.05745
8	15	81.5	18.20713
9	15	82	17.45778
9	15	81.5	18.76702
11	15	81.5	17.70241
11	15	82	18.11931
12	15	82	18.54885
12	15	81.5	17.82168
7	15	82	18.94714
7	15	81.5	18.6576

1	16	82	17.99104
1	16	82	17.28396
2	16	82	20.69792
2	16	82	19.08596
8	16	81.5	18.57178
8	16	81.5	18.68737
5	16	82	17.70011
5	16	82	17.86625
3	16	82	19.54409
3	16	82	20.52942
7	16	82	18.99956
7	16	81.5	18.21132
12	16	81.5	17.77971
12	16	81.5	17.69797
11	16	81.5	18.40023
11	16	81.5	18.10543
9	16	82	17.99416
9	16	82	17.26287
6	16	82	16.50581
6	16	82	18.61268
10	16	82	18.04468
10	16	82	19.15832

7	17	81	18.45818
7	17	82	18.27715
1	17	82	16.7596
1	17	82	18.12542
12	17	82	17.85743
12	17	81.5	17.96639
6	17	82	18.21707
6	17	82	18.46063
2	17	82	19.31397
2	17	82	19.0389
8	17	81.5	17.37573
8	17	81.5	17.86197
10	17	82	19.10173
10	17	82	19.43852
3	17	82	19.64942
3	17	82	17.44585
11	17	81.5	18.5588
11	17	81.5	18.67652
5	17	82	18.14215
5	17	82	18.22893
9	17	82	17.18982
9	17	82	18.10162

8	18	81.5	18.31184
8	18	82	18.48485
1	18	82	20.0304
1	18	82	17.44402
2	18	82	17.80049
2	18	82	17.78762
6	18	82	17.26468
6	18	82	17.84255
5	18	82	16.94566
5	18	82	17.88389
12	18	82	18.4833
12	18	82	18.29386
3	18	82	18.53477
3	18	82	20.43125
10	18	82	19.65762
10	18	82	19.59
11	18	82	17.42966
11	18	81.5	18.55372
9	18	82	18.00927
9	18	82	18.20024
7	18	82	18.84589
7	18	82	18.6316

1	19	82	18.41429
1	19	82	17.28914
7	19	81.5	18.27899
7	19	81.5	19.14507
3	19	82	22.21074
3	19	82	21.05081
2	19	82	19.91152
2	19	82	20.0341
6	19	82	18.76215
6	19	81.5	18.18156
11	19	81.5	18.04872
11	19	80.5	19.61306
9	19	81.5	18.03114
9	19	81.5	18.02248
8	19	81.5	17.8947
8	19	81.5	18.1138
5	19	82	16.90529
5	19	82	18.47156
10	19	81.5	17.83096
10	19	81.5	19.65078
12	19	82	18.18095
12	19	81.5	18.22083

11	20	82	18.95148
11	20	82	18.02274
1	20	82	17.5936
1	20	82	17.92423
7	20	81.5	18.9021
7	20	81.5	18.50429
6	20	82	18.8513
6	20	82	18.70618
12	20	81.5	17.84041
12	20	81.5	18.48245
8	20	81.5	18.37892
8	20	81.5	19.04855
9	20	82	18.25583
9	20	81.5	18.33868
10	20	82	20.3519
10	20	82	19.26599
2	20	82	19.60918
2	20	82	19.69437
5	20	82	16.80698
5	20	82	18.22493
3	20	82	21.87793
3	20	82	21.18233

### Anexo 3. Resultados entre y dentro laboratorios del RT-PCR de LipL32

Lab	Muestra	Corrida	Mt	Cq
1	5	1	82	18.133043
1	5	1	82.5	17.163148
1	7	1	82	19.434495
1	7	1	82	19.220087
1	1	1	82	18.10152
1	1	1	82	18.171966
1	8	1	82.5	16.679334
1	8	1	82	17.293443
1	3	1	82	20.336792
1	3	1	81.5	20.989771
1	2	1	82	19.908628
1	2	1	81.5	19.802696
1	10	1	82	19.328002
1	10	1	82	19.410557
1	11	1	82	18.167054
1	11	1	82	17.593115
1	6	1	82	17.682743
1	6	1	82	17.578465
1	9	1	81	18.149561
1	9	1	82	18.006086
1	12	1	81.5	18.329244
1	12	1	82	17.713235

Lab	Muestra	Corrida	Mt	Cq
2	2	12	82	19.59972
2	2	12	82	19.39025
2	5	12	82	17.77807
2	5	12	82	18.17769
2	9	12	81.5	19.23682
2	9	12	81.5	18.25786
2	1	12	82	17.8916
2	1	12	82	16.98806
2	8	12	81.5	18.62674
2	8	12	81.5	18.00351
2	11	12	81.5	18.87315
2	11	12	81.5	17.69697
2	7	12	81.5	19.6792
2	7	12	81.5	18.3936
2	10	12	82	17.50117
2	10	12	82	19.52656
2	3	12	82	17.51677
2	3	12	82	21.0515
2	12	12	81.5	17.07539
2	12	12	81.5	17.81672
2	6	12	82	18.62848
2	6	12	82	22.10472

## Anexo 4. Pruebas Estadísticas aplicadas al RT-PCR de LipL32

### Precision

	Mean	SD / CV	95% CI	Allowable imprecision
Unknown	18.568352925	1.191151378	0.982152788 to 1.513965937	2.000000000

#### Abbreviated components

	Mean	Within LaB SD	Within LaB CV	Total SD	Total CV
	18.568352925	1.191151378	6.4%	1.191151378	6.4%

#### Detailed components

Component	SD	Exact / Satterthwaite 95% CI	CV	Allowable SD / CV	p-value
Within LaB	1.191151378	0.982152788 to 1.513965937	6.4%		
Between LaB	0.000000000		0.0%		
Total	1.191151378	0.982152788 to 1.513965937	6.4%	2.000000000	<0.0001 <sup>1</sup>

H0:  $\sigma \geq \epsilon$

The imprecision is greater than the allowable imprecision.

H1:  $\sigma < \epsilon$

The imprecision is within the allowable imprecision.

<sup>1</sup> Reject the null hypothesis in favor of the alternative at the 5% significance level.

#### X<sup>2</sup> test

	SD	Expected SD	X <sup>2</sup> statistic	DF	p-value
Total	1.191151378	2.000000000	14.90	42	<0.0001

#### ANOVA

Source	SS	DF	MS	Expected MS
LaB	0.156194774	1	0.156194774	$\sigma_{Error}^2 + 22\sigma_{LaB}^2$
Error	59.591347420	42	1.418841605	$\sigma_{Error}^2$

## Precision

	Mean	SD / CV	95% CI	Allowable imprecision
Unknown	18.583232128	1.356863917	1.270012107 to 1.456564222	2.000000000

## Abbreviated components

	Mean	Within Run SD	Within Run CV	Total SD	Total CV
	18.583232128	1.319263597	7.1%	1.356863917	7.3%

## Detailed components

Component	SD	Exact / Satterthwaite 95% CI	CV	Allowable SD / CV	p-value
Within Run	1.319263597	1.235764760 to 1.414956354	7.1%		
Between Run	0.317211680		1.7%		
Total	1.356863917	1.270012107 to 1.456564222	7.3%	2.000000000	<0.0001 <sup>1</sup>

H0:  $\sigma \geq \epsilon$

The imprecision is greater than the allowable imprecision.

H1:  $\sigma < \epsilon$

The imprecision is within the allowable imprecision.

<sup>1</sup> Reject the null hypothesis in favor of the alternative at the 5% significance level.

X<sup>2</sup> test

	SD	Expected SD	X <sup>2</sup> statistic	DF	p-value
Total	1.356863917	2.000000000	188.71	410	<0.0001

## ANOVA

Source	SS	DF	MS	Expected MS
Run	75.129190894	19	3.954167942	$\sigma_{Error}^2 + 22\sigma_{Run}^2$
Error	7.309917 E+02	420	1.740456439	$\sigma_{Error}^2$

## Precision

	Mean	SD / CV	95% CI	Allowable imprecision
Unknown	81.84	0.299	0.276 to 0.326	0.50

## Abbreviated components

	Mean	Within Run SD	Within Run CV	Total SD	Total CV
	81.84	0.27	0.3%	0.30	0.4%

## Detailed components

Component	SD	Exact / Satterthwaite 95% CI	CV	Allowable SD / CV	p-value
Within Run	0.27	0.26 to 0.29	0.3%		
Between Run	0.12		0.1%		
Total	0.30	0.28 to 0.33	0.4%	0.50	<0.0001 <sup>1</sup>

H0:  $\sigma \geq \epsilon$

The imprecision is greater than the allowable imprecision.

H1:  $\sigma < \epsilon$

The imprecision is within the allowable imprecision.

<sup>1</sup> Reject the null hypothesis in favor of the alternative at the 5% significance level.

X<sup>2</sup> test

	SD	Expected SD	X <sup>2</sup> statistic	DF	p-value
Total	0.30	0.50	97.79	274	<0.0001

## ANOVA

Source	SS	DF	MS	Expected MS
Run	7.50	19	0.39	$\sigma_{\text{Error}}^2 + 22\sigma_{\text{Run}}^2$
Error	31.36	420	0.07	$\sigma_{\text{Error}}^2$

## Precision

	Mean	SD / CV	95% CI	Allowable imprecision
Unknown	81.85	0.304	0.240 to 0.414	0.50

## Abbreviated components

	Mean	Within LaB SD	Within LaB CV	Total SD	Total CV
	81.85	0.29	0.4%	0.30	0.4%

## Detailed components

Component	SD	Exact / Satterthwaite 95% CI	CV	Allowable SD / CV	p-value
Within LaB	0.29	0.24 to 0.37	0.4%		
Between LaB	0.09		0.1%		
Total	0.30	0.24 to 0.41	0.4%	0.50	0.0012 <sup>1</sup>

H0:  $\sigma \geq \epsilon$

The imprecision is greater than the allowable imprecision.

H1:  $\sigma < \epsilon$

The imprecision is within the allowable imprecision.

<sup>1</sup> Reject the null hypothesis in favor of the alternative at the 5% significance level.

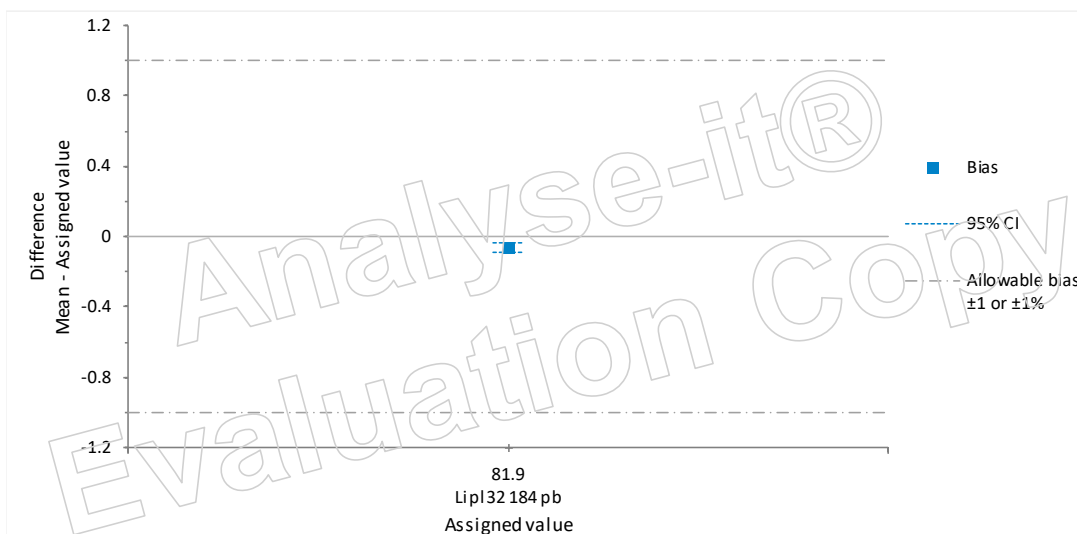
X<sup>2</sup> test

	SD	Expected SD	X <sup>2</sup> statistic	DF	p-value
Total	0.30	0.50	9.99	27	0.0012

## ANOVA

Source	SS	DF	MS	Expected MS
LaB	0.28	1	0.28	$\sigma_{\text{Error}}^2 + 22\sigma_{\text{LaB}}^2$
Error	3.51	42	0.08	$\sigma_{\text{Error}}^2$

**Trueness**



Assigned value	Mean	Bias	95% CI	Allowable bias	TOST p-value
81.90	81.84	-0.06	-0.09 to -0.03	±1.00	<0.0001 <sup>1</sup>

H0:  $|\delta| \geq \epsilon$   
 The bias is not within the allowable bias.

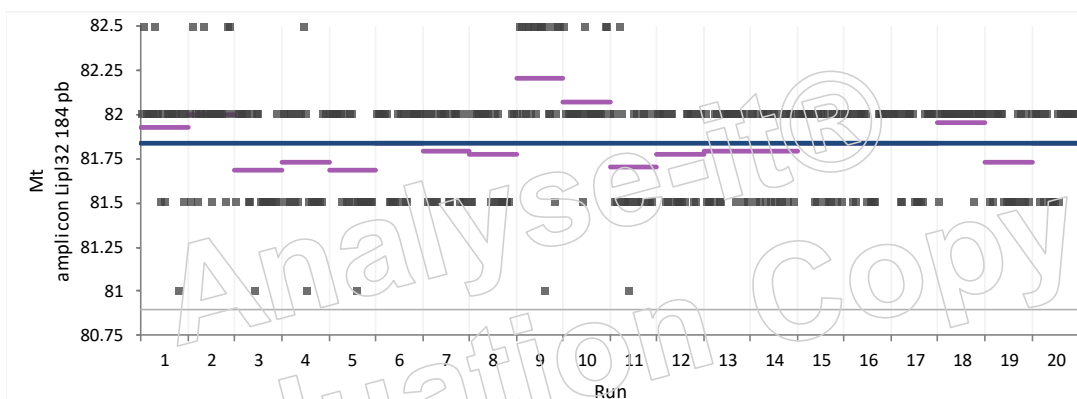
H1:  $|\delta| < \epsilon$   
 The bias is within the allowable bias.

<sup>1</sup> Reject the null hypothesis in favor of the alternative at the 5% significance level.

**TOST Student's t-test**

Assigned value	Difference	SE	Lower t statistic	Upper t statistic	DF	Max p-value
81.90	-0.06	0.01	-74.67	66.33	439	<0.0001

**Descriptives**



N = 440  
 Design = 20 Run x 22 Observations