

Leptospirosis humana una enfermedad no olvidada para Cuba. Investigaciones del Laboratorio Nacional de Referencia, durante el período 2018-2022

Human leptospirosis, a disease not forgotten for Cuba. Research of the National Reference Laboratory, during the Period 2018-2022

Ana Margarita Obregón Fuentes^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-5897-2596>

Eduardo Echevarría-Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0003-4395-9337>

Odisney Lugo-Suárez¹ <https://orcid.org/0000-0003-4965-2985>

Liset Delgado Viera¹ <https://orcid.org/0000-0003-2214-1122>

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), Departamento de Bacteriología-Micología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: amobregon@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: En Cuba existe un Programa de Prevención y el Control para la leptospirosis. El laboratorio de referencia realiza investigaciones para fortalecer el diagnóstico serológico y molecular en casos y fallecidos cubanos que explora variables clínico-epidemiológicas y sociodemográficas.

Métodos: Se realizaron cuatro investigaciones (2018-2022) con muestras clínicas, a las que se le aplicaron los métodos de SD *Leptospira* IgM-IgG, *Leptospira* ELISA-IgM, hemoaglutinación indirecta, microaglutinación con antígenos vivos, PCR a punto final y PCR *Leptospira* 16s RNA Real-TM de *Sacace*TM. Se revisaron las solicitudes del diagnóstico para operacionalizar las variables sociodemográficas y

clínico-epidemiológicas. Se expresaron los resultados en frecuencias absolutas y porcentajes. Se organizaron dos ediciones del curso internacional de leptospirosis con programas dirigidos al fortalecimiento de la clínica, la epidemiología y la microbiología de la enfermedad.

Resultados: Las muestras de los fallecidos y pacientes graves con leptospirosis presentaron altos porcentajes de positividad (74,3 %, 79,7 %). Los métodos serológicos confirmatorios fueron más útiles en muestras extraídas antes del séptimo día (47 %), mientras que la PCR fue útil para el diagnóstico temprano de la infección (32 %), sobre todo, en los pacientes serológicamente negativos. Las variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas mostraron similitudes con lo descrito en la literatura de la enfermedad. La capacitación a 216 individuos incrementó la preparación científica y técnica para su desempeño profesional.

Conclusión: Los resultados demuestran la necesidad de sistematizar el diagnóstico, así como las estrategias de prevención y control de la leptospirosis en Cuba.

Palabras clave: leptospirosis; leptospiras; diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: In Cuba, there is a Prevention and Control Program for leptospirosis. The reference laboratory conducts research to strengthen serological and molecular diagnosis in Cuban cases and deaths; exploring clinical-epidemiological and sociodemographic variables.

Methods: Four investigations (2018-2022) were carried out, with clinical samples, to which the methods of SD *Leptospira* IgM-IgG, *Leptospira* ELISA-IgM, indirect hemagglutination, microagglutination with live antigens, end-point PCR and PCR were applied. *Leptospira* 16s RNA Real-TM from Sacace™. Requests for diagnosis, medical records, and sociodemographic and clinical-epidemiological variables were reviewed. The results were expressed in absolute frequencies and percentages. Two editions of the international Leptospirosis course were organized, with programs aimed at strengthening the clinical, epidemiology and microbiology of the disease.

Results: Serologically and molecularly confirmed high percentages of leptospirae in deceased (74.3%, 79.7%) and critically ill patients with leptospirosis. Confirmatory

serological methods were more useful in samples extracted before the seventh day (47%) and PCR was useful for early diagnosis of infection (32%), especially in serologically negative patients. The sociodemographic and clinical-epidemiological variables showed similarities to what was described in the literature on the disease. The training of 216 individuals increased their scientific and technical preparation and their professional performance.

Conclusion: Laboratory surveillance of leptospirosis in Cuba must be systematized to achieve greater and better impacts on prevention and control and thus reduce the risk of transmission to risk groups.

Keywords: leptospirosis; leptospire; diagnosis.

Recibido: 19/12/2022

Aceptado: 08/03/2023

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución geográfica con un impacto significativo en salud pública y veterinaria. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a esta entidad, como una de las enfermedades reemergentes, "olvidadas o desatendidas", en la región de las Américas.⁽¹⁾ En Cuba existe un Programa de Control y Prevención para la leptospirosis implementado desde el año 1981.⁽²⁾

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en los humanos se producen por las bacterias patógenas del complejo *Leptospira interrogans sensu lato*. La infección en el humano puede ser asintomática o presentarse con signos y síntomas inespecíficos. Para evitar su evolución hacia las formas graves y letales de la enfermedad se requiere realizar un diagnóstico adecuado y oportuno.⁽²⁾

El diagnóstico microbiológico de los casos sospechosos de leptospirosis se realiza mediante las técnicas bacteriológicas, serológicas y moleculares. El cultivo es la prueba de oro y es el

método bacteriológico con mayor especificidad. Las técnicas serológicas (SD *Leptospira* IgM-IgG y *Leptospira* ELISA-IgM, entre otras) detectan los anticuerpos producidos por el individuo contra la bacteria y son las más utilizadas. El diagnóstico *post mortem* de la enfermedad se realiza mediante técnicas histoquímicas y métodos moleculares (PCR a punto final y PCR en tiempo real).^(3,4)

La PCR es muy utilizada para la detección de leptospiras en los tejidos y líquidos corporales, debido a su alta sensibilidad y capacidad para obtener un diagnóstico temprano, rápido y específico. Esta detecta los genes *gryB*, *rrs* (gen del ARNr de la subunidad 16s) y *secY* o genes restringidos a las especies patógenas de leptospiras como *LipL21*, *LipL32*, *LipL4*, *LigA* y *LigB*.⁽⁵⁾

En Cuba desde el 2008 se introduce el diagnóstico molecular (PCR a punto final) en el LNRL-IPK, mediante la aplicación de esta técnica en muestras de tejido obtenida de pacientes fallecidos por leptospirosis. En sus inicios, esta PCR amplifica un fragmento de 423 pb del gen que codifica para la lipoproteína de membrana externa (*LipL32*) de las leptospiras patógenas. Con posterioridad se modifica la PCR implementada con la finalidad de elevar la sensibilidad y se diseñan nuevos cebadores que amplifican un fragmento de 146 pb del mismo gen.^(5,6)

En nuestro medio la mortalidad y la letalidad por leptospirosis necesitan de una atención sistemática por las implicaciones que estas derivan para la salud pública y la economía nacional. Durante los primeros años de este siglo se observa un ligero incremento de estos indicadores en todo el país. En particular, La Habana tiene los porcentajes más elevados desde el 2017.⁽⁷⁾ Sin embargo, entre 2001 y 2010 notifican una tendencia del descenso de la morbilidad por leptospirosis en contraposición con la letalidad, que en el año 2006 muestra un ascenso marcado (tasa 46,8 %). Entre los años 1999 y 2016 notifican porcentaje más alto de fallecidos en los municipios de Arroyo Naranjo (14,7 %), Diez de Octubre (12,6 %), Boyeros (11,6 %), Cotorro y Regla (8,4 %), en el sexo masculino (75 %) y en los grupos de edades comprendidos entre 50 y 64 años, así como en los pacientes con 65 años o más.⁽⁸⁾

De igual forma, la capacitación sostenida de los recursos humanos en la temática de leptospirosis constituye uno de los objetivos primordiales del Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del Instituto Pedro Kourí (LNRL-IPK). Prestigiosas instituciones como el Ministerio de Salud Pública (MINSAP), la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Sociedad Cubana de Microbiología y Parasitología, junto con el Instituto de

Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), auspician de forma periódica la realización de cursos internacionales sobre esta temática. La novena (2018) y la décima edición (2022), realizadas en el Hotel Meliá Habana y el IPK, respectivamente, incluyen otras enfermedades zoonóticas de importancia en la salud pública de los países de las Américas.

Gracias al avance tecnológico introducido en el país, se tiene un mejor conocimiento sobre la circulación de *Leptospira* spp., lo que permite realizar intervenciones en los brotes epidémicos, al proporcionar informaciones que fortalecen al Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis y a los ensayos clínicos de la vacuna cubana vaxSPIRAL®. En el año 2017 se publican aspectos de interés relacionados con la vigilancia de laboratorio y los resultados de las investigaciones del período 1989-2016.⁽⁹⁾ Sin embargo y a pesar de incrementarse la vigilancia serológica-molecular de la leptospirosis con la implementación de herramientas más sensibles y específicas confirmatorias y describirse un porcentaje de positividad mayor, en las muestras clínicas estudiadas se observa que existe una reducción considerable del número de pacientes notificados en Cuba, resultado que contrasta con los estudios del LNRL-IPK. A raíz de lo anterior se requieren realizar nuevas investigaciones que contribuyan al conocimiento actual de la clínica, la epidemiología y la microbiología en los pacientes graves y fallecidos de leptospirosis durante el período 2018 - 2022.

Métodos

Se realizaron cuatro investigaciones durante el período 2018-2022. La primera de ellas consistió en un estudio retrospectivo (2017-2021). En este proyecto se estudiaron 36 órganos frescos (12 pulmones, 12 hígados y 12 riñones) y 35 tejidos embebidos en parafina (11 pulmones, 11 hígados y 13 riñones), además dos orinas y un suero. Las muestras pertenecieron a 36 fallecidos de La Habana.

El segundo estudio fue retrospectivo (2015-2022) y se analizaron fragmentos de 230 tejidos de adultos [215 órganos frescos (74 hígados, 68 pulmones, 68 riñones, 2 corazones, 2 músculos y un bazo), 61 tejidos embebidos en parafina (21 riñones, 19 pulmones, 18 hígados y 3 no identificados)] y 15 de órganos frescos de casos en edades pediátricas (5 pulmones,

5 hígados y 5 riñones). A todas las muestras de estas investigaciones se les aplicó la PCR a punto final.⁽⁵⁾ Los especímenes clínicos se recolectaron de 105 fallecidos cubanos.

El tercer diseño fue descriptivo de corte transversal con un componente analítico (2018-2021). Se seleccionaron 34 pacientes con leptospirosis de La Habana y sus muestras se dividieron en grupos de estudio; el primero estuvo formado por siete sangre total, 30 sueros y 2 orinas; el grupo II: constituido por 30 sueros; el grupo III, integrado por 22 sueros, 7 de sangre total y 2 orinas y grupo IV estuvo creado por todos los pacientes con leptospirosis distribuidos según el intervalo entre fecha de inicio de los síntomas y fecha de toma de muestra. Por ello, se ubicaron en el rango desde el primer al quinto día, siete casos, hasta los siete días, otros siete pacientes y \geq a los ocho días a 20 individuos. Las técnicas aplicadas en esta tarea fueron el SD *Leptospira* ELISA-IgM, la prueba de hemoaglutinación, la técnica de referencia internacional de microaglutinación y la PCR a título final.⁽³⁾⁽⁵⁾

Se realizó una revisión exhaustiva del modelo de solitud de análisis para operacionalizar las variables sociodemográficas, clínico-epidemiológicas de todos los casos estudiados. Los resultados se expresaron en frecuencias absolutas y porcentajes.

Se determinó también la sensibilidad diagnóstica del sistema de PCR *Leptospira* 16s RNA Real-TM de Sacace™ (*Leptospira 16s RNA Real-TM, INC 2017, web: www.sacace.com*) para la detección cualitativa de ARN de *Leptospira* 16s, utilizando 25 sueros de casos sospechosos de leptospirosis, recibidos en el LNRL-IPK en 2018, de los cuales seis habían resultado positivos por otra PCR en tiempo real casera.⁽²²⁾

Para capacitar el recurso humano en la temática de leptospirosis y dentro de las dos ediciones científicas realizadas, se abrieron las convocatorias, una en su modalidad presencial y la otra de forma virtual con enfoque internacional y se confeccionaron programas científicos, que incluyeron conferencias, exposiciones orales y presentación de carteles. Las líneas de ambos eventos se centraron en las temáticas de clínica, epidemiología y microbiología de esta zoonosis.

Resultados

Investigaciones y retos en el diagnóstico post mortem de leptospirosis en Cuba (2018-2022)

De los 26 fallecidos confirmados de leptospirosis en la provincia de La Habana, predominó el sexo masculino (80,7 %), el color de la piel blanca (46,2 %), las edades entre 20 y 59 años (61,5 %), el nivel de escolaridad de preuniversitario (26,9 %), la actividad laboral, con un riesgo mayor en el criador de cerdo (55,5 %) y en aquellos que tenían un contacto directo e indirecto mayor con roedores (42 %). Prevalció el síndrome de Weil (53,8 %) y los síntomas como la fiebre (100 %), las mialgias (80,8 %), la astenia (80,8 %) y el íctero (53,9 %). Asimismo, la hipertensión arterial (HTA) (26,1 %) y el etilismo crónico (15,4 %) fueron los principales antecedentes patológicos (APP). Se destacan la ceftriaxona (38,5 %) como el antimicrobiano más utilizado y la estadía hospitalaria del paciente superior a las 24 horas (57,7 %). Los municipios Arroyo Naranjo (27 %) y Cotorro (15,4 %) aportan el mayor número de decesos. En un 74,3 % de las muestras clínicas se detectan (por PCR) las leptospiras. El riñón fue el órgano de mayor positividad (92 %, $p = 0,00$), asociado al síndrome de Weil ($\chi^2 = 58,3$; $p = 0,00$) y la forma anictérica ($\chi^2 = 42,3$; $p = 0,00$) de la enfermedad.

Del estudio de los 105 fallecidos confirmados a nivel nacional se obtuvo una positividad a *Leptospira* spp., en un 95 % (100/105) de las muestras de los adultos y en un 5 % (5/105) de los occisos en edades pediátricas. El riñón se mostró como órgano de elección [80 % (75/94)] y se relacionó con la forma clínica Ictérica o Síndrome de Weil [adultos 79 % (31/39) y pediátricos 100 % (3/3)]. Predominó el sexo masculino con un 79 % [en adultos: 94 % (78/93) y en edades pediátricas: 6 % (5/83)], el color de la piel blanca (40 %), las edades entre 19 y 59 años [65 % (68/105)], la actividad laboral con riesgo de ser trabajador agropecuario [80 % (19/24), incluyendo dos occisos en edades pediátricas] y la categoría de estudiante (sin riesgo aparente) con un 15 % (6/39), donde se incluyeron dos menores de edad.

Prevalció un 53 % (56/105) de casos fatales que transitaron por la fase de leptospiremia y un 46 % (48/105) que falleció en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Los síntomas predominantes fueron la fiebre (adultos: 89 % y niños: 100 %), el malestar general (adultos: 48 % y niños: 60 %), el íctero (adultos: 47 % y niños: 60 %) y la cefalea (adultos: 44 % y

niños: 60 %). Las mialgias predominaron en tres casos pediátricos (60 %). Asimismo, la hipertensión arterial (21 %) fue el principal antecedente patológico en adultos y la insuficiencia renal (20 %) en edades pediátricas. La ceftriaxona (8 %) resultó el antimicrobiano más utilizado en adultos y en casos pediátricos fueron la vancomicina y la penicilina (20 %). Las provincias de La Habana [adultos: 33 % (33/100); niños: 40 % (2/5)], Villa Clara [adultos: 12 % (12/100)] y Santiago de Cuba [adultos: 13 % (13/100)] presentaron el mayor número de casos fatales. En su mayoría, los resultados coinciden con los reportes científicos consultados, al existir un predominio de los pacientes que murieron luego de acudir tempranamente a las instituciones cubanas de salud. El hallazgo del riñón como órgano diana de las leptospiras en la mayoría de los fallecidos adultos y en todos los pediátricos alerta al Sistema Nacional de Salud cubano sobre el manejo de las posibles complicaciones renales asociadas al fallo renal agudo en los casos que presentan las formas graves de la enfermedad.

Aportes a la vigilancia serológica y molecular de leptospirosis humana en La Habana (2018-2022)

La sensibilidad diagnóstica, del sistema *Leptospira* 16s RNA Real-TM de *Sacace*TM alcanzó un 80 %, al aplicarlas a 25 sueros de pacientes sospechosos de padecer leptospirosis. El 100 % de los sueros positivos por la PCR en tiempo real casera resultó también positivo por la técnica evaluada.

En los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana, confirmados por métodos serológicos y moleculares, predominó el sexo masculino (71 %), las edades de ≥ 60 años, en los pacientes graves (21 %) y entre 20 y 59 años (35 %), en los no graves, el nivel de escolaridad preuniversitario (20 %), así como, el contacto con animales (26 %), con aguas y suelos (12 %) y las actividades agropecuarias (12 %). La estadía hospitalaria superó los siete días (56 %) y prevalecen los pacientes que transitan por la fase de leptospiruria (59 %). No hubo diferencias en los porcentajes de las formas (ictérica y anictérica) y las fases clínicas (leptospiremia, leptospiruria e inmune) de la enfermedad.

Los síntomas y signos más frecuentes en ambas fases fueron la fiebre (78 y 85 %) y la astenia (50 y 65 %); los principales APP la HTA (29 y 35 %), la insuficiencia renal (21 y 25 %) y la hepática (29 y 25 %); el antimicrobiano más utilizado fue la ceftriaxona (43 y 40 %). Se demostró que los métodos serológicos confirmatorios son más útiles en las muestras extraídas después del séptimo día (47 %) y que la PCR es una herramienta útil para el

diagnóstico temprano de la infección (32 %), sobre todo en los pacientes con las pruebas serológicas negativas. Ambos hallazgos no habían sido demostrados con muestras cubanas de casos con leptospirosis.

Formación de recursos humanos

Los diez delegados extranjeros (procedentes de Brasil, Países Bajos, Honduras, Panamá y Estados Unidos), 50 cubanos, tres expertos internacionales (Países Bajos, Estados Unidos y Brasil) y el claustro profesoral cubano, que participaron en la novena edición del curso internacional *Espiroquetas Habana 2018* en su modalidad presencial del 28 de mayo al primero de junio de 2018 abordaron científicamente las temáticas de la epidemiología, la clínica, la microbiología y debatieron los aspectos más relevantes sobre la enfermedad en los humanos y animales, el diagnóstico serológico convencional, de avanzada y el molecular, la caracterización de *Leptospira* spp., los aspectos clínicos y terapéuticos de la leptospirosis, la epidemiología y las vacunas contra la leptospirosis.

De igual manera, y utilizando similares temáticas, los 33 delegados internacionales (procedentes de Colombia, El Salvador, Trinidad-Tobago, y México), los 100 cubanos (representando hospitales y centros provinciales de higiene y epidemiología), los tres profesores expertos de Países Bajos, Israel y Estados Unidos, conjuntamente con el claustro profesoral del IPK, desarrollaron la décima edición en su modalidad virtual del 24 al 26 de mayo de 2022, al cumplimentar el programa científico con la realización de cinco conferencias, 15 exposiciones orales y 10 carteles.

Por último, la vinculación de los estudiantes de pre- y posgrado en los proyectos de investigación del LNRL-IPK, fortaleció también la disciplina del trabajo científico, contemplado en los planes de estudios de las carreras universitarias y de los programas de las maestrías y doctorados. En tal sentido, los resultados descritos se asociaron a cinco tesis y cerca de tres publicaciones científicas, seis ponencias en eventos científicos, la obtención de un “Premio Anual Relevante de Salud” (provincial), un “Resultado Relevante” aprobado por el Consejo Científico del IPK y una propuesta para “Logro de la Academia de Ciencias de Cuba”.

Discusión

Con la realización de este reporte se integra el conocimiento científico sobre la contribución del LNRL-IPK al Programa de Prevención y Control del MINSAP, al describir la utilidad de los métodos de laboratorio en la confirmación de la leptospirosis en fallecidos y pacientes graves. Los resultados alcanzados demuestran científicamente el valor diagnóstico de la PCR implementada en el LNRLB-IPK, técnica que mantiene una alta sensibilidad y especificidad, siendo el método de elección para el diagnóstico de los casos cubanos con sospecha de leptospirosis, en especial durante la fase inicial de la enfermedad; donde el resto de las técnicas descritas no logra el diagnóstico confirmatorio temprano. Esta tecnología posibilita obtener una respuesta rápida y oportuna para los médicos de asistencia y las autoridades de salud pública.^(5,6,10)

De igual manera, el empleo combinado de los métodos serológicos confirmatorios y las tecnologías de genes para el diagnóstico de la leptospirosis han permitido durante los cinco últimos años en Cuba demostrar el valor del uso de diferentes muestras clínicas, colectadas según las fases de la enfermedad (leptospiremia y leptospiruria-inmune). En tal sentido, se confirma una vez más que la serología desempeña un papel importante, si se aplica a muestras extraídas a partir del séptimo día de evolución clínica en los casos sospechosos,^(11,12) mientras que las técnicas moleculares son eficaces en cualquiera de las fases de la enfermedad, lo que resalta la necesidad de mantener la actualización de los algoritmos para la vigilancia y el diagnóstico, con procedimientos de avanzada que permitan conocer la real circulación de *Leptospira* spp. en la provincia La Habana.⁽³⁾

Esta investigación reafirma que el tropismo de las leptospiras ha variado del pulmón al riñón, como principal órgano infectado (92 %, $p = 0,00$), en la mayoría de los fallecidos cubanos por leptospirosis (2018-2022), lo que alerta al Sistema Nacional de Salud en cuanto a la necesidad lograr que el manejo clínico de los pacientes con complicaciones asociadas al fracaso renal agudo sea adecuado e integral, para así incidir en la disminución de las tasas de letalidad y mortalidad de esta entidad clínica en el país.^(13,14)

Por otra parte, la descripción de las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas en los casos graves o fallecidos hablan a favor de que la leptospirosis es una enfermedad presente en nuestros días, que exige la adopción de nuevas estrategias dirigidas a una mejor prevención y control para evitar que los pacientes transiten hacia las presentaciones graves

y la muerte, debido al alto poder de transmisibilidad que tiene *Leptospira* spp. y la existencia de ambientes naturales con un elevado potencial epidémico.^(13,14,15)

De igual manera, y a pesar de que el tratamiento de elección de la leptospirosis siempre son las penicilinas, los hallazgos de este estudio sugieren que la mayoría de los médicos cubanos aplican las cefalosporinas de tercera generación a los casos con esta entidad nosológica. Llama la atención, además, que el uso de la ceftriaxona prevalece en el grupo de pacientes que fallecieron, lo cual pudo deberse a que ellos hayan sido diagnosticados tardíamente.^(13,14,15)

Los resultados obtenidos en este período sugieren la necesidad de fortalecer sistemáticamente los algoritmos de laboratorio, así como las estrategias para la prevención y el control de la leptospirosis a nivel nacional.

Los estudios de posgrado en el ámbito de la educación permanente constituyen un requerimiento fundamental para el fortalecimiento y mantenimiento de la competencia profesional y en última instancia para elevar la calidad de la actividad laboral. La preparación y superación sistemática en la temática de leptospirosis permite incrementar el alcance de los proyectos de investigación, el de las publicaciones científicas y la gestión en la docencia intrínseca con salidas diversas como las tesis de grado. Las capacitaciones realizadas en este período contribuyen a la superación profesional de especialistas y técnicos, lo que refuerza los objetivos trazados en el ámbito pedagógico.

Conclusiones

La leptospirosis humana continúa siendo una enfermedad de importancia médica en la salud pública cubana. Su vigilancia de laboratorio es la piedra angular para comprender todas las situaciones reemergentes en las diferentes regiones geográficas del país. Como enfermedad zoonótica, su prevención y control debe sistematizarse para lograr mayores y mejores impactos en la población cubana y así reducir el riesgo de transmisión a los grupos de riesgo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes colegas por su contribución a la realización de este trabajo: Lic. Meliza Jiménez Rivero, Dra. Leanet de la Caridad Gómez Ocaña, Dra. Beatriz Rodríguez Rodríguez y Lic. Lednys Palomino Zambrano.

Referencias bibliográficas

1. Organización Panamericana de la Salud. Leptospirosis. Washington, D.C.: OPS; 2021; [actualizado 2022; acceso 03/06/2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leptospirosis>.
2. Cao Paredes IT, Parellada Blanco J, Padrón Sánchez A, Véliz Martínez PL, Guzmán Noa ME, Jorna Calixto AR. Comportamiento de la leptospirosis grave en la unidad de cuidados intensivos. Rev cubana med. 2004[acceso 16/06/2021];43(4):13. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232004000400004&nrm=iso.
3. Goris M. Diagnóstico convencional, serológico y molecular de las leptospiras. En: Curso Internacional “Leptospirosis Habana 2022 y otras zoonosis de importancia para la salud pública”. Amsterdam: Department of Medical Microbiology & Infection Prevention; 2022.
4. Delgado F, Brihuega B, Venzano A, Funes D, Blanco Viera F, Auteri C, *et al.* Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído. Rev Cubana Med Trop. 2007 [acceso 28/05/2022];59(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100003&lng=es.
5. Rodríguez Olivera Y, Rodríguez González I, Zamora Martínez Y, Rodríguez Silveira JE, Valdés Labrador Y, Echevarría Pérez E, *et al.* Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011. Rev Cubana Med Trop. 2013 [acceso 18/06/2021];65(2):211-22. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000200008&nrm=iso
6. Núñez M, Fortuna M, Veras B, Medina A, Mena L, Gutiérrez E, *et al.* Efectividad de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) e Inmunodot en el diagnóstico temprano de leptospirosis: análisis comparativo con la prueba de Microaglutinación (MAT). Ciencia y Salud. 2022;6(1):17-24. DOI: <https://doi.org/10.22206/cysa.2022.v6i1.pp17-24>.
7. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Cuba. 2019. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud; 2020 [acceso 19/06/2021]; Disponible en: <https://files.sld.cu/bvscuba/files/2020/05/Anuario-Electr%c3%b3nico-Espa%c3%blol-2019-ed-2020.pdf>

8. Cairo Rojas JM, Vázquez Pérez A. Mortalidad por leptospirosis en la provincia de La Habana 1999-2018. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2018 [acceso 18/09/2022]; pp. 1-6. Disponible en: <http://convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/view/550>
9. Obregón Fuentes AM. Avances de laboratorio sobre la leptospirosis humana en Cuba, 1989-2016. Rev Cubana Med Trop. 2017 [acceso 15/06/2021];69(3):1-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300013&nrm=iso.
10. Noda A, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón A. High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(4):411-15. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-466520140005000>
11. Obregón Fuentes A, Fernández Molina C, Martínez Motas I, Llop Hernández A, Rodríguez González I, Rodríguez Silveira J, *et al.* Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2011 [acceso 30/05/2022];63:239-45. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300007&nrm=iso.
12. Obregón A, Echevarría E, Lugo O, Soto Y. Usefulness of IgM-ELISA test for screening of Leptospirosis in Cuba. AJAS. 2020;8(2). Disponible en: <https://doi.org/10.24203/ajas.v8i2.6067>.
13. Gómez Ocaña LC. Estudio clínico-epidemiológico y molecular de fallecidos con leptospirosis. Tesis para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. La Habana, 2017-2021, IPK; 2021.
14. Palomino Zambrano LL. Impacto del diagnóstico molecular en la confirmación de fallecidos por leptospirosis humana. IPK. 2015-2022. Trabajo de Diploma para optar por el título de Licenciada en Microbiología. Facultad de Biología-IPK; 2022.
15. Rodríguez B. Leptospirosis humana: un acercamiento a su presentación clínica, epidemiológica y microbiológica. La Habana, 2018-2021. Tesis para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. IPK. 2022.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría-Pérez, Odisney Lugo-Suárez.

Curación de datos: Liset Delgado Viera.

Análisis formal: Ana Margarita Obregón Fuentes.

Supervisión: Odisney Lugo-Suárez.

Recursos: Ana Margarita Obregón Fuentes, Liset Delgado Viera.

Investigación: Ana Margarita Obregón Fuentes.

Metodología: Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría-Pérez, Odisney Lugo-Suárez.

Administración del proyecto: Ana Margarita Obregón Fuentes.

Redacción – borrador original: Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría-Pérez, Odisney Lugo-Suárez.

Redacción – revisión y edición: Ana Margarita Obregón Fuentes, Eduardo Echevarría-Pérez, Odisney Lugo-Suárez.