

Ministerio de Salud Pública
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Departamento de Bacteriología-Micología



**Leptospirosis humana: un acercamiento a su
presentación clínica, epidemiológica
y microbiológica. La Habana. 2018-2021**

Autora: Dra. Beatriz Rodriguez Rodriguez.

Tutora: Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes, Dra. C.

Asesores: Dra. Odisney Lugo Suárez, MsC.

Dr. Eduardo Echevarría Pérez, MCs.

**Protocolo de Tesis para optar por el título de
Especialista de Primer Grado en Microbiología**

La Habana, 2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por inspirarme y darme fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más esperados.

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Son las personas más importantes de mi vida.

A mis tíos y primos por estar siempre presentes acompañándome. A mi tía Taty y Carlos, mis segundos padres.

A mi abuela por escucharme y cuidarme cuando lo necesito.

A mi familia toda, gracias por existir.

A mi querida amiga Gretell, doy gracias por su amistad incondicional, por dedicarme su tiempo y brindarme un hombro donde llorar, por estar siempre presta a escucharme, aconsejarme y ayudarme, por darme fuerzas cuando pensaba que no iba a poder, por demostrarme que siempre se puede dar un poquito más y que todo tiene solución. Por aparecer en mi vida, gracias.

A mi novio y su familia por formar parte de este proceso, estar presentes y alentarme.

A mis profesores agradezco:

Por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación, de manera especial a la profesora Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes, Dra.C., por acogerme en su equipo y permitirme realizar todo el proceso investigativo, por dedicarme su tiempo, por darme el privilegio de contar con su experiencia y conocimiento científico, por tenerme tanta paciencia y sobre todo por confiar en mí.

A mis asesores Dra. Odisney Lugo y Dr. Eduardo Echevarría, por su importante colaboración en esta investigación, por su disponibilidad, por su paciencia, por su entrega y dedicación. Sus aportes fueron de gran importancia para este trabajo. Mil veces gracias por permitirme trabajar con ustedes.

Agradezco a mi amiga Lisette por estar siempre dispuesta a ayudarme y brindarme su apoyo y conocimiento para que todo salga lo mejor posible.

Agradecida a todo el claustro de profesores de docencia.

Agradecida con la Dra. Rebeca Margarita Laird Pérez por formar parte de mi formación, por su ayuda y amistad incondicional. A la profesora Maribel Chao por estar ahí para ayudarme en todo momento y por entenderme.

Agradecida además con otros profesores como el Dr. Rafael Llanes, con la Dra. Yasmhín Hernández Carpio del Laboratorio de Microbiología, José Suárez Blanco de Artemisa ; además a trabajadores del centro, por acogerme, brindarme su cariño, conocimientos y experiencias.

A la profesora Ibis Capiro y a sus trabajadores del Pediátrico del Cerro por haberme abierto las puertas.

A las bibliotecarias del instituto, especialmente a Marelis y Yeny, por ayudarme en la confección de mi documento.

Agradezco también a los trabajadores de los hospitales visitados para la obtención de la información. Su ayuda fue de gran importancia.

A mis compañeros de residencia, a todos en general gracias, por compartir a lo largo de este tiempo momentos tristes y felices.

A todas las personas de este Instituto que pusieron un granito de arena para que todo fuera posible, mis más sinceros agradecimientos.

Resumen

La leptospirosis es una zoonosis endémica que produce daños severos en la salud pública humana y veterinaria. Se realiza un estudio de corte transversal con un componente analítico (2018 - 2021), en 34 pacientes con leptospirosis de La Habana, confirmados serológica y molecularmente, usando 30 sueros, siete sangres totales y dos orina. De los casos se operacionalizan las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas. Se demuestra (por vez primera en Cuba) que los métodos serológicos confirmatorios son más útiles cuando se usan muestras extraídas antes del séptimo día de evolución clínica [47% (14/30)]. Se evidencia que la PCR es una herramienta útil para el diagnóstico temprano de la infección [32% (7/22)] aunque es aplicable en cualquiera de las fases clínicas de la enfermedad [100% (31/31)], sobre todo en los pacientes negativos por serología. Predominan los pacientes del sexo masculino (71%), con edades de ≥ 60 años en los enfermos graves (21%) y entre 20 y 59 años (35%) en los no graves. La enfermedad es más frecuente en los infectados con escolaridad de preuniversitario (20%), los que trabajaban con animales (26%), los que realizaban actividades agropecuarias y tenían contacto con aguas y suelos (12%), respectivamente. La estadía hospitalaria supera los siete días (56%) y prevalece el diagnóstico de los pacientes durante la fase leptospirúrica (59%). No hay diferencias entre las formas clínicas icterica (Síndrome de Weil) y anictérica en los pacientes que cursan por la fase aguda y de convalecencia. Los síntomas y signos más frecuentes en ambas fases son la fiebre (78 y 85%) y la astenia (50 y 65%). Los principales APP en los casos que cursan por la fase de leptospiremia o leptospiruria son: la HTA (29 y 35%), la insuficiencia renal (21 y 25%) y la hepática (29 y 25%), en cada una. El antimicrobiano más utilizado en ambas fases clínicas, es la ceftriaxona con un 43 y un 40%, respectivamente. La combinación de métodos serológicos y moleculares de laboratorio en Cuba, confirman tanto la leptospirosis aguda como la convalescente. El estudio sugiere replantear las políticas de salud sobre leptospirosis en la capital cubana, al evidenciar que la infección se está transmitiendo con un alto potencial epidemiológico y a su vez, resalta la necesidad de mantener la actualización de los algoritmos técnicos y las guías de laboratorio, para este diagnóstico en nuestro medio.

Abstract

Leptospirosis is an endemic zoonosis that causes severe damage to human and veterinary public health. A cross-sectional study with an analytical component (2018 - 2021) was conducted in 34 patients from Havana with a leptospirosis diagnosis who were confirmed serologically and molecularly, using 30 sera, seven total blood and two urine samples. The sociodemographic, clinical and epidemiological variables of the cases were operationalized. It was demonstrated (for the first time in Cuba) that confirmatory serological methods are more useful when samples extracted before the seventh day of clinical evolution are used [47% (14/30)]. It was evidenced that a PCR test is a useful tool for the early diagnosis of infection [32% (7/22)], although it could be used in any of the clinical phases of the disease [100% (31/31)], especially in serologically negative patients. It predominated male patients (71%), severe cases aged ≥ 60 years (21%), and non-severe cases aged between 20 and 59 years (35%). The disease was more frequent among patients with a high school education level (20%), who worked with animals (26%), and who carried out agricultural activities and had contact with water and soil (12%). Hospital stay exceeded seven days (56%) and patients were diagnosed during the leptospiruric phase (59%). There were no differences between the icteric (Weil's syndrome) and anicteric clinical forms in patients during the acute and convalescent phases. The most frequent signs and symptoms in both phases were fever (78 and 85%) and asthenia (50 and 65%). The main personal pathological antecedents during the leptospiremia or leptospiruria phases were: high blood pressure (29 and 35%), and renal (21 and 25%) and hepatic (29 and 25%) failure, in each case. The most commonly used antimicrobial in both clinical phases was ceftriaxone (43% and 40%, respectively). The combination of serological and molecular laboratory methods in Cuba confirms both acute and convalescent leptospirosis. This study suggests rethinking health policies on leptospirosis in the capital of Cuba, as it evidences the transmission of the infection with a high epidemiological potential and, at the same time, highlights the need to continue updating the technical algorithms and laboratory procedures for this diagnosis in our setting.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Definición y Sinonimia.....	5
2.2 Antecedentes históricos	5
2.2.1 Antecedentes en Cuba	6
2.3 Agente etiológico	7
2.3.1 Características generales	7
2.3.2 Taxonomía.....	8
2.3.3 Características genéticas.....	9
2.3.4 Estructura antigénica	9
2.3.5 Factores de virulencia	10
2.3.6 Respuesta Inmune	11
2.3.7 Patogenia.....	12
2.4 Epidemiología.....	13
2.5 Manifestaciones clínicas	15
2.6 Tratamiento.....	16
2.7 Diagnóstico.....	17
2.7.2 Hallazgos de laboratorio clínico	17
2.7.3 Diagnóstico microbiológico.....	18
2.7.3.2 Diagnóstico serológico	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Diseño de estudio y periodo	23
3.2 Marco de la investigación	23
3.3 Universo de estudio	23
3.4 Muestra	23
3.5 Procedimientos	24
3.6 Definición y operacionalización de las variables	26
3.7 Análisis estadístico.....	30
3.8 Consideraciones éticas	30
3.10 Limitaciones del estudio	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Conclusiones.....	59
Recomendaciones.....	60

Bibliografía.....	61
Anexos	69

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis constituye la enfermedad zoonótica de mayor impacto en salud pública debido a los daños que ocasiona desde el punto de vista económico y social.⁽¹⁾ La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a esta entidad como una de las enfermedades reemergentes y "olvidadas o desatendidas" en la región de las Américas.⁽²⁾ En Cuba existe un Programa de Control y Prevención, que se sustenta en las acciones que realizan los centros que atienden las zoonosis en todas las provincias del país.⁽³⁾

El cuadro clínico que la caracteriza en los humanos lo ocasionan las bacterias que se incluyen en el complejo patogénico *Leptospira interrogans sensu lato*.⁽²⁾ Se estima que a nivel mundial cada año casi un millón de individuos enferma de leptospirosis y cerca de 60 000 fallecen. Debido a las características del agente etiológico, la incidencia anual de esta enfermedad varía en países de climas templados y tropicales entre 0,1 y 10 casos por 100 000 habitantes, aunque cuando ocurren brotes puede llegar a ser de 100 por cada 100 000 habitantes.⁽⁴⁾

Los patrones característicos de la transmisión de la leptospirosis son de tipo epidémico y endémico, que incluye el esporádico. Los factores más importantes para la aparición epidémica son las situaciones de desastres naturales asociados, por lo general, al cambio climático, entre ellas destacan las lluvias estacionales, las inundaciones, las deficiencias higiénicas que ocasionan alta infestación por roedores y la existencia de poblaciones no controladas de perros. Por otro lado, la esporádica requiere que el ser humano se ponga en contacto con entornos contaminados en su quehacer profesional, o de forma accidental por el contacto con animales domésticos enfermos o durante la recreación en aguas que pudieran estar contaminadas.⁽³⁾ Esta zoonosis se considera un riesgo ocupacional para los ganaderos, veterinarios, agricultores, cultivadores de arroz y caña de azúcar, limpiadores de alcantarillas y personal militar.⁽⁵⁾

La infección por *Leptospira* spp. en el ser humano puede ser asintomática o presentarse con signos y síntomas inespecíficos, como cefalea, mialgias, náuseas, vómitos, diarrea, erupción cutánea, dolor abdominal, eritema conjuntival y esplenomegalia. En los casos graves, puede presentarse compromiso orgáni-

co, choque séptico, dificultad respiratoria, miocarditis, rabdomiólisis, vasculitis, hemorragia y disfunción hepática o renal. Las estadísticas indican que el 10 % de los individuos que desarrollan cuadros graves, fallecen por esta causa,^(4, 6) pero cuando al menos un órgano entra en insuficiencia, la mortalidad se eleva a más del 50 %. Por otra parte, el pronóstico de las formas no graves de la enfermedad, en general, es bueno y la mortalidad no es superior al 9,7 %.⁽⁷⁾

El diagnóstico microbiológico de los casos sospechosos de leptospirosis (pacientes con síntomas y antecedentes epidemiológicos de posible exposición a la bacteria) se realiza mediante diferentes técnicas bacteriológicas, serológicas y moleculares. Los métodos que detectan los anticuerpos producidos por el individuo contra la bacteria son los que más se utilizan, por las ventajas que tienen sobre los métodos bacteriológicos y moleculares. Entre las pruebas serológicas utilizadas en el mundo están la prueba de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT, por sus siglas en inglés), considerada como el método de referencia para el serodiagnóstico de esta entidad y la técnica de ensayo inmunoenzimático, (ELISA, por sus siglas en inglés). Asimismo, entre las pruebas de detección directa del microorganismo se hallan, el aislamiento y cultivo de las leptospiras a partir de la sangre, orina u otros materiales clínicos; las técnicas de tinción inmunológica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). De todas ellas el aislamiento de leptospiras es la prueba de oro para este diagnóstico. En el caso del diagnóstico post mortem, se pueden utilizar las técnicas serológicas, el cultivo, la inmunofluorescencia directa y la PCR.⁽⁵⁾

Debido a que la presentación clínica de la leptospirosis es inespecífica, los pacientes pueden diagnosticarse de manera tardía, lo que eleva el riesgo de que desarrollen complicaciones y fallezcan. Para evitar estas consecuencias se requiere realizar un adecuado diagnóstico diferencial, un oportuno diagnóstico microbiológico, así como propiciar que el manejo de los pacientes con cuadros graves en los que se sospeche la enfermedad sea en la unidad de cuidados intensivos.⁽⁴⁾

En Cuba, la leptospirosis humana, muestra un comportamiento endemo-epidémico, con un carácter cíclico estacional, enmarcado en tres etapas evolu-

tivas bien diferenciadas: la primera (1980-1990), con una tendencia ligera y creciente; la segunda, (1991-1994), por un elevado y brusco ascenso en la morbilidad de la enfermedad; y la tercera (1995-2019), caracterizada por una sostenida reducción en cuanto a morbilidad.^(8, 9) La literatura nacional recoge algunos estudios clínicos epidemiológicos que se concentran en la descripción de aspectos relacionados con individuos que enferman por leptospirosis, en algunas de las provincias del país, en diferentes periodos de tiempo.^{(8, 9) (10)}

Problema científico:

En los últimos diez años en Cuba se ha incrementado de vigilancia serológica-molecular de la leptospirosis, a través del estudio de las muestras recibidas el en LNRLB-IPK precedentes de pacientes con sospecha clínica epidemiológica de la enfermedad. Con el de cursar de los años, se observa una ligera reducción del número de pacientes que se notifican a nivel nacional, pero, de manera particular resalta La Habana, provincia donde a pesar de que las individuos notificaciones se encuentran en descenso, los estudios del laboratorio de microbiología indican que el número de muestras positivas ese elevado. Por las razones expuestas se requiere de nuevas investigaciones que impacten en el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad en la capital cubana.

Por ello nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Qué sexo, edades, actividades laborales, nivel técnico profesional, lugar de residencia y que tipo de contacto con reservorios, tuvieron los casos con leptospirosis de La Habana (2018-2021)?

¿Qué cuadro clínico, complicaciones y antibióticoterapia tuvieron los casos con leptospirosis de La Habana (2018-2021)?

¿Qué muestra clínica y técnica brindará mayor confirmación de laboratorio y que relación tendrán con las fases y formas clínicas de la enfermedad?

Para dar respuesta a esas preguntas nos trazamos los siguientes objetivos:

- Identificar los principales factores socio-demográficos, clínicos y epidemiológicos y el comportamiento temporo-espacial, en los casos que cursan con leptospirosis humana en La Habana (2018- 2021).
- Determinar la frecuencia de leptospiras, en muestras clínicas, según técnicas serológicas – moleculares utilizadas y su relación con las fases y formas clínicas de la enfermedad, en los casos que cursan con leptospirosis en La Habana (2018- 2021).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definición y Sinonimia

La leptospirosis humana es una enfermedad zoonótica, infectocontagiosa causada por cepas patógenas del género *Leptospira* que son transmitidas directa o indirectamente de los animales al hombre, con presentaciones clínicas que puede variar desde formas asintomáticas a fallo multiorgánico con desenlace fatal. ⁽¹¹⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga a la leptospirosis como una enfermedad tropical desatendida. ⁽¹²⁾ Entre sus denominaciones más habituales se encuentran Enfermedad de Weil, ictericia espiroquética hemorrágica, fiebre del ceno, fiebre de los cañaverales, enfermedad de los arrozeros, fiebre canícola y fiebre otoñal, entre muchas otras. ^(13, 14)

2.2 Antecedentes históricos

En la historia de la humanidad se han descrito numerosas enfermedades que han influido negativamente sobre la supervivencia del hombre. Dentro de ellas, merece especial mención la leptospirosis. ⁽¹⁵⁾ Las reseñas más antiguas de la enfermedad datan desde la época de la invasión napoleónica a Egipto a través de reportes realizados por Larrey en el Cairo. ⁽¹⁶⁾ Mas tarde, en 1883, Luis Landouzy fue el primero en describir la leptospirosis humana como una entidad clínica distinta; mientras que en 1886 Adolfo Weil describió en trabajadores agrícolas una enfermedad grave de alta mortalidad caracterizada por fiebre, ictericia, hemorragia e insuficiencia hepática y renal, a la que en 1888 se le comienza a llamar Enfermedad de Weil en honor a tan destacado investigador. ⁽¹⁷⁾

Luego, en 1907, Stimson pudo visualizar al microorganismo en un corte de riñón de un paciente muerto por fiebre amarilla y, debido a su morfología, lo nombró *Spirochaeta interrogans*. ⁽¹⁸⁾ Mientras que en 1917, Hidego Noguchi, un bacteriólogo japonés que trabajaba en América, aisló el agente en un medio elaborado por él y sugirió para este género el nombre de *Leptospira*. ⁽¹⁸⁾

El primer aislamiento en humanos fue en ese mismo año, de un paciente con íctero y manifestaciones hemorrágicas, por lo que se le llamó *icterohemorrhagiae*.⁽¹⁹⁾ Los medios para el cultivo de leptospiros comenzaron a desarrollarse desde 1918 y en la década de 1920 se aísla un microorganismo con las mismas características pero ubicuo en el medio ambiente y no patógeno para el hombre, se le denominó *Leptospira biflexa*. De igual manera, a medida que pasaba el tiempo se enriquecían los conocimientos clínicos, patológicos y epidemiológicos de la enfermedad.⁽²⁰⁾

2.2.1 Antecedentes en Cuba

En Cuba, los doctores Reynaldo Márquez Camacho, Emilio Soler Montes y Arturo Curbelo Hernández, presentaron el primer caso confirmado de leptospirosis, cuyo diagnóstico comprobaron bacteriológicamente en 1945. Posteriormente, en 1956, los doctores Curbelo y Viola Márquez Biscay, publicaron la recopilación de 177 casos con diagnóstico clínico de la llamada Enfermedad de Weil, que fueron notificados en La Habana de 1945 a 1955, de los cuales 45 se confirmaron serológicamente usando antígenos de la *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*.⁽¹⁹⁾

En 1972, se recibió en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) una asesoría por parte del profesor E. Kmety, consultor de la OMS, con el objetivo de establecer técnicas de laboratorio necesarias para el cultivo de leptospiros y estudios serológicos, lo que permitió que se investigara en diferentes especies de animales en trabajadores de alto riesgo, lo cual permitió la identificación de diversas cepas. A partir de ese momento los brotes epidémicos se identificaron en todas las regiones del país, fundamentalmente en oriente. En 1980, en la provincia Camagüey, se produjo un brote de gran magnitud; el municipio Florida fue el más afectado, de cuyo estudio epidemiológico derivó la necesidad de establecer un Programa Nacional de Control de la Leptospirosis Humana (PNCLH).^(3, 19) Desde 1981 se cuenta con el Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis que abarca tanto la salud humana como animal, el que se perfeccionó a partir de 1997 donde se enfatiza en la necesidad de fortalecer la prevención primaria.

(3)

2.3 Agente etiológico

2.3.1 Características generales

Las leptospiras son bacterias gramnegativas, aerobias estrictas, con una longitud de 6-20 μm y un diámetro de 0,1 μm . Son microorganismos helicoidales, flexibles y con una leve curvatura en uno o ambos extremos, en el caso de las patógenas. El cuerpo de la bacteria está formado por un cilindro protoplasmático helicoidal que le confiere motilidad y posee un antígeno somático común responsable de la inmunidad protectora. Además, cuenta con dos filamentos axiales y una envoltura externa formada por tres o cinco capas que rodean todo el microorganismo.^(6, 13, 18), 20)

Desde el punto de vista bioquímico, estas bacterias son catalasa y oxidasa positivas, pero las especies no pueden diferenciarse por pruebas bioquímicas. Aunque son bacterias Gram negativas, no se tiñen mediante los colorantes convencionales, por lo que se visualizan por medio de la microscopía de campo oscuro. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28-30 °C y requieren de que los medios tengan un pH que oscile entre 7,2 y 7,6.⁽¹⁸⁾ Las leptospiras pueden crecer, además, en varias líneas celulares cultivadas in vitro, principalmente fibroblastos, observándose su efecto citopático, pero de cualquier modo el tiempo de generación de las cepas patógenas es de aproximadamente 20 horas, el de las saprófitas de cinco.⁽²¹⁾

Leptospira spp. no se multiplica fuera del hospedero, para que así sea depende de un medio adecuado para su supervivencia, ya que es un género susceptible a la desecación y a otros factores como la luz solar directa, la hipersalinidad, los desinfectantes, los detergentes y el jabón. No obstante, las espiroquetas son capaces de sobrevivir hasta 180 días en agua dulce, tres semanas en aguas estancadas y hasta cerca de un año en soluciones viscosas con bajo contenido de materia orgánica. En suelo húmedo sobreviven por largo tiempo, mientras que en suelo seco la supervivencia es corta. Por otra parte, conservan su viabilidad varios días en vísceras y carnes refrigeradas, mientras que en el frío pueden sobrevivir hasta 100 días a -20 °C.^(18, 22)

2.3.2 Taxonomía

El género *Leptospira* (Gr. Lepto = fino y espira = espiral) es el único de la familia *Leptospiraceae*, perteneciente al orden *Spirochaetales*, clase *Spirochaetia* y fylum *Spirochaetes*.⁽²³⁾

Históricamente, el género *Leptospira* se ha dividido en dos grupos, *Leptospira biflexa sensu lato*, que es el que incluye las leptospiros saprófitas que son las de vida libre, no patógenas, que se encuentran en ambientes húmedos y aguas superficiales; *Leptospira interrogans sensu lato*, que engloba a las especies patógenas causantes de la leptospirosis y que, de acuerdo con sus características serológicas, se clasifican en serogrupos constituidos por serovares.⁽²⁴⁾ *L. interrogans* y *L. biflexa*, se diferencian a través pruebas fenotípicas que se basan en la capacidad de crecimiento de leptospiros saprófitas a 13 °C y en presencia de 8 azaguanina. No obstante, a partir de 1987 la clasificación y diferenciación de estas especies se basó en la homología del ADN medida por técnicas de hibridación, la cual es la técnica estándar para la especiación del género *Leptospira*. Otros aspectos empleados en la diferenciación son las características en cuanto a patogenicidad y virulencia de las especies.⁽²⁵⁾

En la actualidad, el género *Leptospira*, comprende 35 especies filogenéticamente separadas en tres grupos: 13 patógenas, 11 saprófitas y 11 intermedias. Los agentes que causan enfermedad son los que pertenecen a las especies intermedias y patogénicas de *Leptospira*. Estos incluyen más de 260 serovares.⁽¹⁶⁾

En los últimos años, el empleo de técnicas moleculares y el incremento del uso de la información genómica han permitido la identificación de 21 genomo-especies: nueve patógenas (*L. alexanderi*; *L. weilii*; *L. borgpetersenii*; *L. santarosai*; *L. kmetyi*; *L. alstonii*; *L. interrogans*; *L. kirschneri*; *L. noguchii*), seis intermedias (*L. licerasiae*; *L. wolffii*; *L. fainei*; *L. inadai*; *L. broomii*; *L. idonii*) y una cifra similar no patógenas (*L. vanthieli*; *L. biflexa*; *L. wolbachii*; *L. terpstrae*; *L. meyeri*; *L. yanagawae*). De esta forma, algunos de los serovares patógenos, frecuentes en animales, ahora corresponden a otra especie como es el caso de

L. interrogans serovar *Grippotyphosa* que ahora es *L. kirschneri* serovar *Grippotyphosa*.⁽²⁶⁾

2.3.3 Características genéticas

El genoma de las leptospiiras cuenta con un contenido de GC de entre el 35 % y el 41 %. El mismo, está distribuido en cromosomas circulares: uno grande, el cromosoma I, y otro pequeño, el cromosoma II; con un rango de longitud aproximado entre 3500-4300 y un total de 4 627 366 (pb), el cromosoma I con 4 277 185 (pb) y el cromosoma II con 350 181 (pb). Esta variabilidad en la longitud del genoma confiere a las bacterias la capacidad de vivir en diversos entornos y hospedadores. Las leptospiiras saprófitas poseen, además, un tercer replicón circular denominado p74, que ha sido relacionado con su sobrevivencia.^(25, 27)

La tecnología de secuenciación de ADN se continúa empleando para realizar análisis comparativos de la diversidad de genes entre leptospiiras saprófitas y patógenas, y entre las diferentes especies de leptospiiras patógenas, para lograr una mejor comprensión de este patógeno bacteriano. La secuenciación de nuevos aislamientos de *Leptospira* de diferentes regiones del mundo contribuyen a enriquecer el conocimiento sobre esta enfermedad.⁽²⁸⁾

2.3.4 Estructura antigénica

Las variaciones en las cadenas laterales de carbohidratos determinan la diversidad antigénica observada entre las diferentes cepas de *Leptospira*. La estructura antigénica de esta especie es complicada. En ella se define el serovar como la unidad básica, a que está representado por una cepa de referencia de acuerdo a las similitudes y diferencias antigénicas que se encuentren. Los antígenos localizados en la membrana externa facilitan la clasificación en serotipos (serovares), mientras que existen otros comunes a todo el género *Leptospira* localizados más profundamente. Se conoce que *Leptospira interrogans* se subdivide, según su composición antigénica, en 218 serotipos (serovariedades), que por las reacciones antigénicas cruzadas entre ellos, se reúnen en 28 serogrupos.⁽²⁹⁾

De igual modo, la identificación de proteínas antigénicas expresadas durante la infección por leptospirosis tiene una implicación importante para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico serológico y para la producción de vacunas.
(30)

2.3.5 Factores de virulencia

Los factores que influyen en la virulencia de las leptospiras son poco entendidos. Algunos serovares tienden, en general, a causar una enfermedad leve, mientras otros ocasionan una enfermedad severa. Sin embargo, no existe una presentación específica de la infección para un serovar, pues depende también de factores relacionados con el paciente tales como la edad, patologías asociadas y el estado inmunológico. La dosis infectante también puede tener influencia en el curso de la leptospirosis.⁽³¹⁾

No obstante, entre los factores de virulencia identificados que podrían influir en la patogenia de la infección y la enfermedad por *Leptospira* spp., se incluyen el LPS (que se considera un factor de virulencia general de las bacterias gram-negativas), las hemolisinas, las proteínas de la membrana externa (OMP), otras proteínas de superficie y las moléculas de adhesión.⁽³²⁾

De igual modo, existen factores genéticos que se reconocen como de virulencia. Tal es el caso del gen de la lipoproteína de superficie Loa22, altamente conservado en las leptospiras patógenas y expresado en la fase aguda de la enfermedad. Además, han sido detectados otros cinco genes codificadores de esfingomielinasas, entre ellos el gen sphA y sphH, que codifica para la esfingomielinasa C y la SphH, respectivamente, las cuales tienen función de lisis celular de eritrocitos y contribuyen al daño del endotelio de pequeños vasos.⁽²²⁾

Por otro lado, se han identificado los genes lig (lig A y lig B), que codifican proteínas de superficie que contienen dominios parecidos a las inmunoglobulinas, las cuales se unen a la elastina, tropoelastina, laminina y fibronectina; genes que codifican proteínas de membrana parecidas a la endostatina humana que se unen a la laminina, fibrinógeno y fibronectina; y el gen lipL32, que codifica la

lipoproteína, altamente conservada en leptospirosas patógenas, se une al colágeno I, IV, V, laminina y a la fibronectina dependiente de calcio.⁽²⁵⁾

2.3.6 Respuesta Inmune

A pesar de que las leptospirosas no son bacterias facultativas intracelulares, pueden vivir brevemente en las células del hospedero y, se sabe que se pueden mover rápidamente a través de las monocapas celulares in vitro. Ellas habitan en el citoplasma o compartimentos fagosomales en células no fagocíticas. En los macrófagos humanos, escapan del fagosoma al citoplasma donde se multiplican y se produce la apoptosis de la célula, lo que indica que *Leptospira* spp. ha desarrollado un mecanismo de escape fagosomal para evadir el sistema inmunológico y dispersarse rápidamente a varios tejidos del huésped para causar la infección.⁽³³⁾

Por otro lado, durante la infección las especies patógenas de *Leptospira* desencadenan una fuerte activación de neutrófilos y de la respuesta proinflamatoria. Los neutrófilos son importantes en el control de microorganismo, pero también contribuyen con el daño de tejidos en el hospedero porque estimulan la formación de netosis que es un tipo de muerte celular, pero en ausencia de estos se incrementa la posibilidad de leptospirosis.⁽³⁴⁾ Los macrófagos también juegan un papel importante en la eliminación de la bacteria. Su mecanismo efector junto con una eficiente respuesta de citoquinas está relacionado con el control fagocítico y de la diseminación de la infección.⁽³⁵⁾ De igual manera, las especies patógenas de *Leptospira* inducen una respuesta inmune mediada por linfocitos T y B, acompañada con la expresión de citoquinas que son fundamentales en la eliminación temprana de la infección, pero su producción no controlada puede conducir a la falla multiorgánica.⁽³⁶⁾

Por su parte, la respuesta humoral específica contra leptospira se caracteriza por la producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA. De hecho la detección de IgM se utiliza para el diagnóstico temprano de leptospirosis.⁽³⁷⁾ El efecto de la respuesta humoral en humanos con leptospirosis ha permitido que se realice el diagnóstico serológico después de la infección natural. Pero el aspecto más

importante de la respuesta humoral en la infección con leptospira es la formación de anticuerpos protectores contra la el serovar infectivo. ⁽³⁸⁻⁴¹⁾

2.3.7 Patogenia

Las leptospiras penetran en el organismo humano a través de pequeñas heridas o erosiones de la piel o mucosas (conjuntiva y nasofaringe) y llegan rápidamente al sistema circulatorio para luego alcanzar los órganos afectados; el ciclo vital se completa cuando la leptospira atraviesa el intersticio y el túbulo proximal de los riñones. La penetración de la bacteria en los tejidos se ve facilitada por el movimiento de excavación de estas bacterias y por la secreción de enzimas, entre ellas la colagenasa y esfingomielinasa. Estas proteínas interactúan directamente con componentes de la matriz extracelular del huésped, como colágeno, fibronectina y laminina. Además, estas bacterias activan también directamente el paso de plasminógeno a plasmina; la principal enzima del sistema fibrinolítico.⁽³¹⁾

Por otra parte la formación de los complejos inmunitarios circulantes contribuyen a la afectación renal y a la disfunción endotelial que sufre el individuo enfermo, no obstante, el principal daño producido por las leptospiras se localiza en el endotelio de los vasos y capilares (vasculitis infecciosa), provocando extravasación de la sangre, anoxia e isquemia local, y generación de radicales libres de oxígeno, condiciones que favorecen daños graves con la aparición de las complicaciones.⁽⁴²⁾

A nivel renal, se produce inflamación aguda y crónica que puede avanzar hacia acidosis tubular aguda (ATA) y nefritis, también se afecta la regulación de líquidos y electrolitos asociando poliuria e hipokalemia; en el hígado existe una pérdida de la estructura celular y obturación de los conductos biliares; razón por la cual se desencadena la ictericia. A nivel pulmonar, existen áreas hemorrágicas abundantes y una adhesión anormal de las plaquetas a las células endoteliales; a nivel cardiovascular existe destrucción directa de plaquetas por medio del agente infeccioso que desencadena una hemorragia pericárdica y endocárdica; con posterior daño directo a los miocitos y presencia de necrosis diseminada y dilatación ventricular.^(31, 43)

2.4 Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial (exceptuando la Antártida) que afecta a humanos y animales. Es causada por bacterias pertenecientes al género *Leptospira* y la infección humana se asocia a elevados índices de morbilidad y mortalidad, pues cada año aparece más de un millón de nuevos casos y ~60 000 muertes. ^(6, 44) Su incidencia es más mayor en poblaciones rurales de áreas de climas tropicales y subtropicales y en áreas inundables, presentando picos epidémicos entre junio y noviembre.⁽⁴⁵⁾ Los factores medioambientales más relevantes en la dinámica de transmisión de *Leptospira* spp. son la temperatura, la humedad y la precipitación fluvial, a estos se les asocian otros como la densidad poblacional, tipo de vivienda, la sanitización del agua de consumo, el manejo de residuos y la deforestación.⁽⁴⁶⁾

La transmisión de las leptospirosis inicia con la presencia de reservorios y hospederos que portan estas bacterias en sus túbulos renales, desde donde son excretadas a través de la orina (leptospiruria), lo que contamina el agua, el suelo, alimentos, etc. De esta forma *Leptospira* spp., permanece viable en esos ambientes hasta infectar a nuevos hospederos susceptible.⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾ La infección en seres humanos aparece generalmente por la exposición accidental a orina conteniendo espiroquetas o por contacto con algún medio contaminado. Las otras vías documentadas son: contacto con secreciones, tejidos y/o sangre de individuos positivos, inhalación de aerosoles e ingesta de alimentos antihigiénicos. La infección también se transmite por la mordida de animales positivos.⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾

La leptospirosis en seres humanos también puede ser adquirida a través de actividades ocupacionales, recreativas o exposiciones en laboratorios. Por ello, se presenta con mayor frecuencia en trabajadores que están en contacto con animales, con sus productos y/o subproductos, que laboran en terrenos húmedos y/o zonas semi inundadas, y que conviven inadecuadamente con sus mascotas. Otros factores que conllevan un mayor riesgo de transmisión son la inadecuada disposición de basura y alcantarillado, contacto con aguas de regadío o residuo, caminar descalzo en calles no pavimentadas y/o encharcadas y compartir la vivienda con reservorios u hospederos.^(48, 51-54)

En Cuba, el comportamiento epidémico de esta enfermedad ha estado enmarcado en tres etapas bien diferenciadas: la primera (entre 1980 y 1990) presentó una tendencia ligeramente ascendente, la segunda (de 1991 a 1994) se caracterizó por un marcado aumento del número de casos, mientras que durante la tercera etapa (de 1995 a 2002) se observó una franca reducción.⁽⁵⁵⁾ Actualmente ocupa el sexto lugar entre las enfermedades de declaración obligatoria.⁽⁵⁶⁾

En cuanto a la prevención de esta entidad nosológica han sido propuestas múltiples estrategias para lograrla, entre las más importantes figuran la inmunización y uso de quimioprofilaxis, que van a depender de las circunstancias ambientales y el grado de actividad humana. Por otra parte, las medidas de protección en zonas de alto riesgo de contagio con leptospirosis comprenden el uso de guantes, botas, protectores oculares en trabajadores con alto riesgo de exposición con secreciones directas o indirectas de animales infectados, como herramientas más efectivas. Otras estrategias como el control de roedores, la prevención de las inundaciones, la identificación y tratamiento de animales enfermos también han sido descritas como efectivas.⁽⁵⁷⁾

En el caso particular de Cuba la quimioprofilaxis comprende a todos aquellos individuos que realizan temporalmente actividades o labores en suelos y fluviales contaminados con *Leptospira* (riesgo pre exposición). En tales situaciones se suelen destacar militares y trabajadores agrícolas temporales. La quimioprofilaxis en esos casos consiste en el uso de doxiciclina 200 mg semanales, hasta una semana después de la exposición.^(58, 59)

En nuestro país la vacunación se efectúa con la vacuna antileptospirósica trivalente vaxSPIRAL de producción nacional, la cual es una suspensión de células enteras inactivadas de *Leptospira interrogans*, perteneciente a los serogrupos *Canicola* (serovar canícola), *Icterohaemorrhagiae* (serovar *copenhageni*) y *Pomona* y tiene una eficacia cercana al 80 %.⁽⁶⁰⁻⁶³⁾

2.5 Manifestaciones clínicas

El período de incubación de la leptospirosis es de siete a 26 días, con un promedio de 12 días. La expresión clínica de esta enfermedad varía desde procesos totalmente asintomáticos o leves (que no alcanzan a diagnosticarse), pasando por formas de evolución generalmente benignas, hasta el desarrollo de cuadros graves, de carácter icterohemorrágicos, con colapso vascular y serio compromiso de las funciones hepática y renal. (64, 65)

En los seres humanos la leptospirosis se manifiesta como una enfermedad bifásica. La primera fase abarca del día primero al séptimo y se conoce como fase de leptospiremia o septicémica febril, corresponde a la multiplicación y propagación del microorganismo en todo el organismo y se caracteriza por la aparición de síntomas inespecíficos y fiebre mayor de 39 °C. En la mayoría de los pacientes la enfermedad se resuelve después de esta primera semana de síntomas, pero entre el 5 y el 15% de ellos evolucionará hacia la fase tardía desarrollando manifestaciones graves. La segunda fase inicia al octavo día y culmina con la resolución del cuadro clínico. En ella se desarrollan los anticuerpos y se eliminan las leptospiras en la orina. Los síntomas y signos dependen del órgano en el que se localicen las leptospiras. (67, 68)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) declara que las formas clínicas de la leptospirosis humana son las siguientes:

- Leptospirosis anictérica: cuadro inicial leve con síntomas de tipo gripal caracterizados por mialgias, tos seca, lesiones conjuntivales, fiebre súbita de 39-40°C, escalofríos, cefalea frontal intensa, asociados a síntomas inespecíficos como náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarreas.

- Leptospirosis icterica: llamada también síndrome de Weil, se caracteriza por ictericia con colestasis y hepatomegalia, que se asocia a un cuadro inicial exacerbado y/o falla renal, hemorragias con alteraciones de las plaquetas (petequias, equimosis, hematemesis, hemoptisis, melenas), o miocarditis con arritmias.

- Meningitis/meningoencefalitis: aparición de meningitis atípica.

-Hemorragia pulmonar con falla respiratoria: síntomas de neumonía atípica.⁽⁶⁶⁾

Además de la enfermedad de Weil, existen otras complicaciones que pueden provocar la muerte del paciente, entre las más frecuentes se encuentran la nefropatía por leptospiras, el síndrome hemolítico-urémico, la hemorragia pulmonar, la hemorragia gastrointestinal y, con menos frecuencia, las hemorragias subaracnoidea o suprarrenal. ^(48,71)

2.6 Tratamiento

En los pacientes con alta presunción clínica de leptospirosis se recomienda iniciar el tratamiento con antibióticos lo antes posible, sin esperar los resultados de laboratorio, porque esta decisión influye en que disminuya la gravedad del cuadro clínico, así como la duración de la enfermedad en de dos a cuatro días. ⁽⁷³⁾

En los pacientes con síntomas leves, la doxiciclina es el fármaco de preferencia (100 mg por vía oral, dos veces al día), si no existen contraindicaciones. Otras opciones son la azitromicina (500 mg por vía oral), la ampicilina (500-750 mg por vía oral, cada seis horas) y la amoxicilina (500 mg por vía oral, cada seis horas), todos durante siete días, con excepción de la azitromicina cuyo régimen es de seis. Con relación a este antimicrobiano es importante señalar que estudios actuales demuestran su mayor eficacia con relación a la doxiciclina, por lo que se recomienda como alternativa antibiótica el tratamiento de la leptospirosis humana no icterica. ^(67, 68)

Por otra parte, en los pacientes con enfermedad grave, la penicilina por vía intravenosa es el fármaco de preferencia (1.5 MU por vía intravenosa, cada 6 horas), y la ceftriaxona (1g por vía intravenosa, cada 24 horas) ha demostrado ser igualmente eficaz, por lo que algunos protocolos la incluyen como tratamiento de primera línea. En cualquiera de los casos se debe tener especial cuidado en el manejo de este antibiótico para evitar toxicidad sistémica relacionada con la dosis y sobre todo con el aumento de nitrógeno uréico en sangre.⁽⁶⁷⁾

Es importante señalar que el paciente con enfermedad de Weil o con fallo de algún órgano, necesita ser internado en la unidad de cuidados intensivos con vigilancia continua, medidas generales de hidratación, control de signos vitales, vigilancia de la diuresis, oximetría, estudios de imagen, así como seguimiento diario de función renal, hepática, CPK, y hemograma y leucograma.⁽⁴³⁾

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial debe realizarse de acuerdo con la presentación clínica de la enfermedad, ya sea icterica o anictérica. Se deben descartar otras enfermedades febriles que cursen con cefalea y mialgias como dengue, hepatitis viral aguda, íctero obstructivo y hemolítico, meningitis bacteriana, paludismo, fiebre amarilla, hantavirus, influenza, covid 19, rickettsiosis, brucelosis, necrosis tubular aguda, entre muchas otras. ^(56, 66, 69, 70)

2.7.2 Hallazgos de laboratorio clínico

Los exámenes de laboratorio clínico permiten la orientación del médico de asistencia. En el hemograma, la mayoría de las veces se observa leucocitosis (con una franca neutrofilia; la eritrosedimentación se presenta aumentada y el coagulograma puede ser normal, aunque a veces la actividad de la protrombina plasmática puede estar disminuida. Por otro lado, hasta el 50 % de los enfermos presentan trombocitopenia leve, que se relaciona con la insuficiencia renal. De igual modo puede existir elevación de la bilirrubina y de la fosfatasa alcalina en suero, un incremento leve de las aminotransferasas, y el alargamiento del tiempo de protrombina en el Síndrome de Weil. Cuando hay reacción meníngea, predominan al principio leucocitos polimorfonucleares y más tarde células mononucleares. En la orina aparecen alteraciones del sedimento (leucocitos, eritrocitos y cilindros hialinos o granulados), pudiendo existir desde una proteinuria leve, hasta una insuficiencia renal y azoemia en los casos graves. ⁽⁵⁶⁾

2.7.3 Diagnóstico microbiológico

Los métodos de laboratorio pueden dividirse en: directos (aislamiento, cultivo y técnicas moleculares) e indirectos o serológicos. A través de las técnicas serológicas se detectan anticuerpos; y las técnicas moleculares detectan ácidos nucleicos de *Leptospira* patógena. ⁽⁷¹⁾

En cuanto a las muestras clínicas para el diagnóstico, cabe destacar que durante el período septicémico las útiles son la sangre total y líquido cefalorraquídeo para realizar técnicas de diagnóstico directo; el suero se utiliza para comparar el resultado de los estudios serológicos que se realicen en la fase inmune. Las muestras de sangre deben tomarse antes del tratamiento con antimicrobianos; no se utilizan medios de transporte, esta se inocula directamente en el medio de cultivo. El líquido de hemodiálisis es otra muestra útil durante esta fase clínica. Todos los especímenes son provechosos para diagnóstico molecular ⁽⁷²⁾

Por otra parte, durante la fase inmune las muestras clínicas útiles son: orina para cultivo y suero para detección de anticuerpos. Se utilizan sueros pareados tomando una segunda muestra de 7 a 10 días después de la primera (tomada en la fase septicémica), si es necesario se puede estudiar una tercera muestra colectada una semana después de la última extracción. Las muestras post mortem más adecuadas son riñón (parte cortical), hígado, pulmón y bazo, así como sangre del corazón o líquido cefalorraquídeo. ⁽⁷²⁾

2.7.3.1 Aislamiento, cultivo, serotipificación.

Las leptospirosas pueden ser aisladas de muestras de sangre, LCR y líquido de diálisis peritoneal, si se toma muestra en los primeros 10 días de la enfermedad, mientras el paciente permanezca febril y no se haya iniciado tratamiento antimicrobiano. En el caso de la orina, su rendimiento para esta prueba es óptimo luego de la primera semana de enfermedad. ^(56, 57, 73, 74)

El aislamiento del agente etiológico constituye la regla de oro para el diagnóstico de leptospirosis. El cultivo es difícil porque las condiciones para su crecimiento *in vitro* son muy exigentes, los medios para lograrlo son comerciales y

entre los más importantes figuran el EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) o Fletcher. Los cultivos son generalmente incubados a 30 °C por algunas semanas debido a su crecimiento lento (13 semanas). El crecimiento in vitro se observa utilizando la microscopía de campo oscuro. ^(56, 57, 73, 74) Es importante señalar que la inoculación intraperitoneal de animales de laboratorio con plasma fresco, sangre u orina, es una técnica sensible para el aislamiento, aunque se usa poco por su complejidad y demora en los resultados. ⁽⁷²⁾

A partir del aislamiento en el cultivo de leptospira, se pueden utilizar técnicas serológicas tradicionales o técnicas moleculares para la detección de las distintas especies. Entre las pruebas moleculares utilizadas se encuentran Restricción de fragmento de longitud del polimorfismo (*Restriction Fragment Length Polymorphism*-RFLP en inglés), Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*-PFGE en inglés), Secuencia de Tipificación de Múltiples Locus (*Multilocus Sequence Typing* -MLST en inglés), Análisis de Repetición en Tándem de Múltiples Locus (*Multiple-Locus Variable-Analysis*-MLVA en inglés), los cuales se aplican en el análisis epidemiológico de la leptospirosis. La tipificación de los aislamientos resulta útil para la vigilancia de los serovares patógenos circulantes a nivel local, así como del reconocimiento de nuevos patrones de presentación de la enfermedad y la evaluación de la efectividad de las medidas de intervención. ^(56, 57)

2.7.3.2 Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas desempeñan un papel importante para ratificar la infección porque permiten demostrar en un breve período de tiempo, la presencia de inmunoglobulinas (IgM o IgG) producidas contra *Leptospira* spp., superando en rapidez, sencillez y bajo costo al cultivo y a algunas técnicas moleculares. ⁽⁷⁵⁾

La detección de IgM y por la Técnica de Microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés) se considera el estándar de oro del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica (serovar/serogrupo) en comparación con las otras pruebas disponibles. Sin embargo, en ocasiones sus resultados no pueden ser concluyentes debido a la dificultad de obtener segundas muestras serológicas del paciente que permitan observar la seroconversión cuando en la primera

muestra se presentan resultados negativos o títulos bajos. Por otra parte, contra esta prueba conspira el que algunos laboratorios no dispongan de un gran número de cepas de referencia de *Leptospira* spp. Otras limitaciones de esta prueba incluyen la necesidad del mantenimiento de cultivos vivos, la verificación de la identidad de los serovares utilizados y los posibles resultados falsos negativos si el serovar no está incluido en el panel de antígenos ^(76, 77)

Existen otras técnicas serológicas como los sistemas serológicos rápidos dirigidos a la pesquisa de anticuerpos contra *Leptospira* spp. (métodos basados en la inmunocromatografía de flujo lateral). Además, se destaca el análisis inmunoadsorbente ligado a una enzima (ELISA, siglas en inglés), como métodos comerciales que detecten tanto IgM como IgG, así como técnica serológica de la Hemaglutinación pasiva que permite detectar IgM para identificar las infecciones recientes.⁽⁷⁸⁾

2.7.3.3 Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular de la infección por leptospirosis cada vez es más utilizado por su gran sensibilidad y especificidad, aunque no todos los laboratorios pueden implementarlo porque requiere de tecnología de avanzada y personal entrenado. Las tecnologías de genes destacan en la actualidad porque permiten la detección rápida y de la infección activa cuando se aplica a muestras de suero, sangre total, orina o líquido cefalorraquídeo, siempre para la elección del espécimen se tenga en cuenta la fase en que se encuentre la enfermedad. De igual manera, resultan útiles para el diagnóstico post mortem a partir de muestras de órganos frescos o tejidos embebidos en parafina o formalina. ⁽⁷⁹⁻⁸³⁾

Los métodos de diagnóstico molecular para la detección de leptospirosis, incluyen la PCR convencional, la PCR en tiempo real (qPCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y los métodos de amplificación isotérmica. Estos se han diseñado para la detección de genes conservados (*housekeeping*) comunes a todas las especies de *Leptospira* spp. (*16S rrs*, *secY*, *gyrB*) o de genes presentes en especies patógenas (*lipL32*, *lfb1*). ⁽⁸⁴⁾

La diana más utilizada en el diagnóstico por PCR convencional o en tiempo real es el LipL32, que codifica para una lipoproteína presente en la membrana de las leptospirosis patógenas.⁽⁸⁵⁾ Se conoce que la qPCR presenta ventajas con

respecto a la PCR convencional que versan en el menor tiempo de ensayo, la automatización, el menor riesgo de contaminación cruzada, la posibilidad de cuantificar el producto obtenido, la mayor sensibilidad debido al bajo límite de detección (103 bacterias/ml) y la mayor especificidad.⁽⁸⁵⁾

No obstante, Una limitante de la PCR convencional y la PCR en tiempo real (qPCR) es la inhabilidad para identificar el serovar infectante, lo cual no tiene mucha importancia para el manejo de un paciente individual pero si tiene un valor epidemiológico significativo, y para la salud pública porque puede indicar la fuente de infección y los reservorios, y así establecer medidas para prevenir y controlar la enfermedad. Por su parte, la electroforesis de campo pulsado (PFGE) es una herramienta que permite la identificación de serovares de *Leptospira*.^(86, 87) A pesar de ello, las técnicas de PCR son las herramientas diagnósticas a través de las cuales se logra el diagnóstico precoz de la enfermedad, lo que permite instaurar un tratamiento y evitar la aparición de las formas graves.⁽⁸⁴⁾

2.8 Posicionamiento estratégico de la autora sobre la temática

A juicio de la autora, las referencias bibliográficas que se consultan sobre la temática de leptospirosis para confeccionar la tesis, con énfasis en la sección de su clínica, epidemiología y diagnóstico de laboratorio, están la mayoría hilvanadas a través de todo el tiempo. Muchos autores, toman en consideración las descripciones de otros y sobre estos preceptos asientan sus nuevas investigaciones. Pero, cuando se busca información científica y técnica sobre el estudio del tema en La Habana, en contraste, se observó que tanto en Cuba como a nivel mundial, los trabajos publicados no son sistemáticos ni abundantes. No obstante, se constata que existe un consenso, entre la mayoría de los autores, en cuanto a la descripción de las variables tomadas en consideración en esta investigación, que con mayor frecuencia provocan la enfermedad de los pacientes, a los avances en el desarrollo e implementación del diagnóstico de laboratorio de la enfermedad, y en cuanto a la descripción de los principales factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección. Por las razones expuestas, la autora, decide sustentar el diseño y análisis de los resultados de

la presente investigación, en las publicaciones que abordan el estudio de los casos con leptospirosis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de estudio y periodo

Investigación descriptiva de corte transversal con un componente analítico (2018 - 2021).

3.2 Marco de la investigación

La investigación se efectuó en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Leptospiras* (LNRL) del IPK. Este laboratorio es el sitio idóneo para realizar las actividades asociadas a la vigilancia, referencia y diagnóstico microbiológico especializado, porque posee, entre otros aspectos, el equipamiento tecnológico necesario y el personal entrenado para brindar estos servicios, aún en situaciones de emergencia relacionadas con esta enfermedad infectocontagiosa.

3.3 Universo de estudio

Todas las muestras clínicas de casos con síntomas, signos y antecedentes epidemiológicos, compatibles de leptospirosis, llegadas al LNRLB-IPK procedentes de hospitales de la provincia de La Habana, en el periodo comprendido entre 2018- 2021.

3.4 Muestra

Para la realización de la presente investigación se seleccionaron las muestras clínicas que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Que fueran remitidas por hospitales de La Habana.
- Que estuviesen acompañadas de la información clínico-epidemiológica pertinente, en particular FIS/FTM.
- Que se confirmaran como positivos a leptospirosis por *Leptospira* ELISA-IgM, HAT, MAT y/ o PCR en el LNRL-IPK.

Las muestras seleccionadas se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo I: 39 muestras clínicas (siete sangres totales, 30 suero y dos orinas) pertenecientes a 34 pacientes confirmados con leptospirosis en el LNRL-IPK.

Grupo II: 30 sueros, pertenecientes a 30 pacientes estudiados por *Leptospira* ELISA-IgM, HAT, MAT

Grupo III: 31 muestras estudiadas por PCR (22 sueros, siete sangres totales y dos orinas) pertenecientes a 27 pacientes.

Grupo IV: 34 pacientes con leptospirosis confirmados, distribuidos según Intervalo entre FIS y FTM (1 – 5 días: siete casos, hasta siete días: siete casos y $\geq$ ocho días: 20 casos).

3.5 Procedimientos

Los estudios retrospectivo y prospectivo contaron con la revisión exhaustiva del registro primario de los casos con leptospirosis existentes en las bases de datos del LNRL-B, con la finalidad de seleccionar los procedentes de los hospitales de La Habana, que cumplieran con los criterios de inclusión referidos en el acápite 3.4. Para conocer los antecedentes clínicos y epidemiológicos de los confirmados, además, se revisaron las solicitudes de diagnóstico o modelos para la recolección de información del laboratorio (ver anexo 1) y/o las historias clínicas, según se disponía en cada caso.

En particular, los sueros, incluidos en este capítulo, se pesquisaron utilizando la tecnología serológica rápida *Leptospira* IgM-IgG de flujo lateral (anexo 2), según las recomendaciones descritas por Smits *et al* (2000a, 2000b y 2001a)⁽⁸⁸⁾ y el protocolo de trabajo publicado por (BIO-LINE Standard Diagnostics, INC, 2021, [http://www. standardia.com](http://www.standardia.com)). De igual forma, estas muestras fueron confirmadas, unas a través de la técnica serológica de MAT (anexo 3); siguiendo las recomendaciones establecidas en el PNO de los años en estudio del LNRL (IPK) y la metodología descrita por Hartskeerl *et al* (2008)⁽⁶²⁾ otras con el uso de la técnica de HAT (anexo 4), de igual forma, incluida en el PNO de los años en estudio, del LNRL (IPK). Por último, a un grupo de sueros, las sangres totales y las orinas se les realizó la confirmación molecular a través de la herramienta de PCR a punto final (anexo 5), que amplificó un fragmento de 146 pb que codificó para el gen de la proteína de membrana externa LipL32 presente en todas las leptospirosis patógenas, según lo descrito por Noda *et al.*, en 2014.⁽⁸²⁾

Todas las muestras se conservaron a -20°C , hasta su uso en el LNRL del IPK.

3.6 Definición y operacionalización de las variables

Las variables a explorar se describen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Variables sociodemográficas, clínicas, epidemiológicas y su operacionalización para los casos graves por leptospirosis. La Habana (2018-2022).

Variable	Clasificación	Categoría de la escala	Definición de las categorías de la escala
Resultado por SD Leptospira IgM/IgG	Cualitativa nominal dicotómica	- Positivo - Negativo	Se consideró positivo cuando apareció una línea púrpura en el control, y en la línea M, y/o G. Negativo todo lo contrario
Resultado por Leptospira ELISA- IgM	Cualitativa nominal dicotómica	- Positivo - Negativo	Se consideró positivo IAC ≥ 11 . Negativo ≤ 11
Resultado por HAT	Cualitativa nominal dicotómica	- Positivo - Negativo	Se consideró positivo título ≥ 80 . Negativo < 80
Resultado por MAT	Cualitativa nominal dicotómica	- Positivo - Negativo	Se consideró positivo título ≥ 160 y negativo < 160
Resultado por PCR	Cualitativa nominal dicotómica	- Positivo -Negativo	Se consideró como positivo la visualización del amplicón a la altura de las 146 pb y como negativo lo contrario
Leptospirosis grave	Cualitativa nominal dicotómica	-Si -No	Se consideró un cuadro de Leptospirosis grave cuando se presentó: choque séptico, dificultad respiratoria, miocarditis, rabdomiólisis, vasculitis, hemorragia y fallo de uno o varios órganos a la vez, con énfasis en el hígado y el riñón.
Leptospirosis no grave	Cualitativa nominal dicotómica	-Si -No	Se consideró un cuadro de leptospirosis no grave cuando se presentó un paciente con pronóstico favorable (signos y síntomas inespecíficos que permitieron su manejo clínico sin complicaciones) y sin tener lesiones residuales (excepto en iridociclitis)
Grupos de edades	Cuantitativa Continua	≤ 19 años -20- 59 años	Se consideró la edad en años cumplidos

		- ≥ 60 años	
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	- Masculino - Femenino	Según sexo biológico
Fecha de ingreso y egreso	Cualitativa nominal politómica	- Enero- junio 2018 - Julio- diciembre 2018 - Enero- junio 2019 - Julio- diciembre 2019 - Enero- junio 2020 - Julio- diciembre 2020 - Enero- junio 2021 - Julio- diciembre 2021	Según el momento del año en el que estuvieron ingresados
Fecha inicio de los síntomas y Fecha de toma de muestra	Cualitativa nominal dicotómica	- dd/mm/año - dd/mm/año	Según HC
Municipio de residencia	Cualitativa nominal politómica	-Arroyo Naranjo -Boyereros -Centro Habana -Cerro -Cotorro -Diez de Octubre -Guanabacoa -La Habana del Este -La Lisa -Marianao -Playa -Plaza de la Revolución -Regla -San Miguel del Padrón	Según el municipio en que estaba residiendo en el momento de enfermar
Nivel de escolaridad	Cualitativa nominal politómica	- Primaria - Secundaria básica	Se consideró según el nivel escolar vencido

		- Obrero calificado - Preuniversitario - Universitario	
Actividad laboral	Cualitativa nominal dicotómica	<u>Con riesgo</u> - Contacto con animales - Actividades agropecuarias - Contacto con aguas y suelos <u>Sin riesgo</u> - jubilado - ama de casa - funcionario político - Cuentapropista - No refiere	Se detalló la actividad laboral específica que realiza el paciente
Antecedentes epidemiológicos compatibles con Leptospirosis 30 días antes del inicio de los síntomas	Cualitativa nominal politómica	<u>Permanentes</u> -Recolección de basura -Limpieza de alcantarillas -Limpieza de túneles -Contacto directo con animales salvajes (roedores) -Contacto directo con animales domésticos (perros, cerdos, caballos) -siembra o recolección de arroz, caña de azúcar, etc. -Trabajo de construcción -Contacto con aguas estancadas (ríos o presas) <u>Temporales</u> Similares a los anteriores	Se considerará que los antecedentes epidemiológicos asociados al riesgo de contraer la infección eran permanentes cuando se relacionaban con la profesión o con estilos de vida mantenidos por el paciente en el tiempo. Se consideraron temporales cuando la actividad de riesgo se realizó por cortos periodos de tiempo (menores de tres meses).

Antecedentes patológicos personales (APP)	Cualitativa nominal politómica	-Hipertensión arterial (HTA) -Diabetes mellitus (DM) -Asma bronquial -Insuficiencia cardíaca -Insuficiencia renal -Otro ¿Cuál?	Según lo descrito en la historia clínica.
Fases Clínicas	Cualitativa nominal dicotómica	-Fase Leptospirémica -Fase Leptospirúrica e Inmune	Según lo descrito en la historia clínica.
Formas clínicas	Cualitativa nominal politómica	- Forma subclínica - Forma anictérica - Forma ictérica (Síndrome de <i>Weil</i>)	Según lo descrito en la historia clínica
Tratamiento antimicrobiano	Cualitativa nominal politómica	-Penicilinas -Cefalosporinas -Tetraciclinas -Otros ¿Cuál?	Se especificó el tipo de antibiótico empleado.
Complicaciones	Cualitativa nominal politómica	- Shock séptico - FMO - Bronconeumonía - SDRA - Hemorragias - Insuficiencia respiratoria aguda - Insuficiencia renal aguda - Otro ¿Cuál? - No existieron	Según lo descrito en la historia clínica

3.7 Análisis estadístico

La información de la investigación se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel®. Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 3.1. ®

Las variables en estudio se expresaron según sus respectivas medidas de resumen. Para las variables cuantitativas se utilizaron la media y la desviación estándar, mientras que las cualitativas se trabajaron con números absolutos y relativos. Para conocer si existían asociaciones estadísticas entre los principales factores socio-demográficos, clínicos, epidemiológicos y microbiológicos en los pacientes graves con leptospirosis de La Habana se utilizó la Prueba de χ^2 de Pearson y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Los resultados se expusieron en tablas y gráficas para su mejor comprensión.

3.8 Consideraciones éticas

3.8.1 Procedimientos para garantizar aspectos éticos en las investigaciones.

En la presente investigación no se reveló la identidad ni la información de aquellos pacientes a los que se les revisaron sus solicitudes de diagnóstico historias clínicas, según correspondió. Los resultados de las pruebas de laboratorio se utilizaron solo con fines científicos por el equipo de investigación, se usaron códigos numéricos para la confección de la base de datos y solo la responsable del estudio y los investigadores a cargo de la investigación tuvieron acceso a la información, que se almacenó en formato electrónico y se protegió en salvas en el LNRB-IPK.

Se tuvieron en cuenta los principios básicos de la bioética establecidos en la Declaración de Helsinki⁽⁸⁹⁾ (beneficencia, no maleficencia, respeto a la persona y justicia). Los resultados del estudio incidieron e incidirán en el beneficio de la comunidad ya que permitirán adoptar medidas que fortalezcan el Programa de Control y Prevención de la Leptospiriosis en la Habana.

La investigación, está comprendida como tarea dentro de un Proyecto Asociado a Programa aprobado cuyo título es: "Vigilancia serológica-molecular de Leptospiriosis y Brucelosis en provincias cubanas" con código: PnoAP 21006, previamente aprobada por la CCEM y el comité de ética con dictamen: 21006.

3.8.2 Publicación de los resultados, participación en congresos y eventos, uso para propósitos pedagógicos

Los resultados de este estudio se publicarán y se presentarán en eventos científicos bajo la autorización de la comisión científica y de ética. Los nombres de los casos, ni ningún otro identificador se utilizarán en las publicaciones, ni en las presentaciones.

3.8.3 Aspectos de bioseguridad

El personal encargado del procesamiento de las muestras se capacitó e instruyó en relación con las buenas prácticas y el uso de equipos de protección personal, según lo dispuesto en el Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Microbiología. En todo momento se cumplió con las buenas prácticas y con las medidas de bioseguridad para el trabajo y la manipulación de los microorganismos, atendiendo a nivel de riesgo establecido por la OMS y por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006.

3.9 Calificación y experiencia del investigador para el estudio propuesto

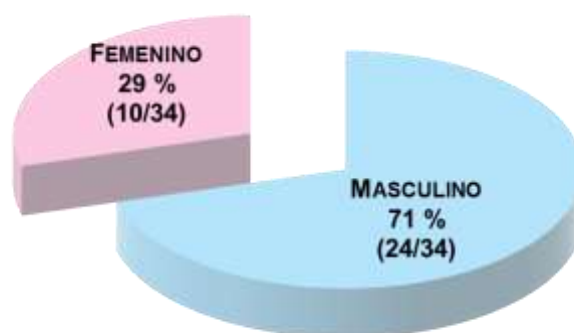
La investigadora inició la Carrera de Medicina en La Facultad de Ciencias Médicas de Artemisa en el año 2014. En el año 2019 comenzó su Internado Vertical en la Especialidad de Microbiología en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, donde realizó su examen estatal y se graduó de Doctora en Medicina. En esta Institución se destacó apoyando al diagnóstico microbiológico de la pandemia Covid 19 y en el trabajo asistencial en el área hospitalaria; además de actividades propias de su residencia, donde adquirió habilidades para la realización de este proyecto de investigación.

3.10 Limitaciones del estudio

La investigación realizada, fue afectada por la contingencia nacional de la covid-19, al verse deprimido el diagnóstico y el envío de muestras clínicas al laboratorio. Por otro lado se vio limitada por la carencia de la información clínica – epidemiológica que acompañaba a las muestras positivas de los pacientes con sospecha de Leptospirosis procedentes de los hospitales seleccionados de La Habana. Esto generó que el número de la muestra de estudio fuera pequeña, aspecto que influyó en los resultados finales. Por otro lado, reconocemos que el hecho de que solo se estudiaran muestras de la capital puede determinar un sesgo al expresar el comportamiento del país.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se muestra la distribución según el sexo de los pacientes con leptospirosis de La Habana (2018-2021), que formaron parte de la presente investigación. Nótese que en los 34 pacientes que formaron parte del estudio predominó el sexo masculino con un 71 % (24/34).



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 1. Distribución según sexo de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

Diversas investigaciones realizadas en Cuba resaltan el predominio del sexo masculino entre los individuos que enferman con leptospirosis. Tal es el caso de la que realizan Díaz y cols. en el año 2018 en la provincia de Pinar del Río, donde comentan que son hombres el 79,6 % (89/113) de los 113 casos confirmados con leptospirosis entre enero de 2014 y diciembre de 2015, en el servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Quirúrgico “Dr. León Cuervo Rubio.”⁽³⁾ Otra investigación realizada en Holguín por Pupo y cols. (2022) describe que los varones prevalecen con el 82,14 % (24/29) entre los 29 pacientes ingresados con leptospirosis humana diagnosticados en el Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Iñiguez Landín”.⁽⁹⁰⁾ De igual manera, Rodríguez y cols. (2022) en Camagüey, subrayan el predominio del sexo masculino [81,0 % (73/90)] entre los 90 pacientes infectados por *Leptospira* spp., entre los años 2012 y 2020 en esa provincia.⁽⁹¹⁾

De igual modo, la literatura consultada indica que a nivel internacional predomina el mismo comportamiento. Cedano y cols. (2019), en Colombia, encuentran que el 73 % (63/87) son hombres al analizar las características demográficas y clínicas de 87 pacientes con diagnóstico de leptospirosis grave, hospitalizados en salas generales o atendidos en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de cuarto nivel.⁽⁴⁾ Por otro lado, Nuñez y cols. (2022), en República Dominicana reportan igual predominio con

94,2 % (63/69), entre los 69 pacientes con diagnóstico de leptospirosis entre 2010 y 2012 del Hospital Regional “José María Cabral y Báez”.⁽⁹²⁾

En 2021, Zambrano y cols., realizan un estudio con el objetivo de identificar factores de riesgo potenciales ante la leptospirosis como zoonosis en porcicultores y trabajadores del matadero del cantón Portoviejo, Manabí, Ecuador, y encuentran que existe un predominio del sexo femenino con el 57 %, entre los 107 pacientes estudiados y positivos en el período comprendido de enero de 2014 a diciembre de 2017. Estos investigadores atribuyen este comportamiento inusual a que en estas regiones geográficas, por ser extremadamente pobres, las amas de casa realizan también actividades en el matadero, propias del sexo masculino ⁽⁹³⁾

Según criterio de la autora, el predominio del sexo masculino entre los que adquieren la infección por leptospirosis se relaciona con los factores de riesgo descritos para contraer la enfermedad, en particular con determinadas ocupaciones que por lo general son realizadas por hombres. Se conoce que dentro de las profesiones más frecuentes que ellos practican figuran la agricultura, la ganadería, la veterinaria, la tala de árboles, la limpieza del alcantarillado, la siembra de arroz y las actividades militares.

La tabla 2 muestra la distribución, según los grupos de edades, en los 34 pacientes con leptospirosis en La Habana (2018 - 2021). Nótese, que en sentido general existe un predominio del rango de edades entre los 20 a 59 años, para un 47 % (16/34), entre los individuos con leptospirosis. Sin embargo, al realizar el análisis de esta variable en función de las presentaciones clínicas de la enfermedad, resalta que en el rango de 20 a 59 años también, predominan los pacientes que no cursaron con formas graves, para un 35 % (12/34), mientras que entre los mayores de 60 años prevalecen los que presentan complicaciones con el 21 % (7/34).

Según Rodríguez y cols., en 2001, en Cuba, la edad avanzada es una condición reconocida, como uno de los factores que de forma directa incide en el incremento de la morbilidad y mortalidad por leptospirosis.⁽⁹⁴⁾

Tabla 2. Distribución de las edades de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

Variable (años)	Presentaciones clínicas % (n/N)		Total % (n/N)
Grupos de edades	Graves 50 (17/34)	No graves 50 (17/34)	
≤ 19	17 (6/34)	9 (3/34)	26,5 (9/34)
20 a 59	12 (4/34)	35 (12/34)	47 (16/34)
≥ 60	21 (7/34)	6 (2/34)	26,5 (9/34)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

En otro estudio que se realiza en el año 2018, en Cuba, Díaz y cols., en el servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Quirúrgico “Dr. León Cuervo Rubio” de Pinar del Río, se recoge que las edades comprendidas entre los 40 y 49 años, sobresalen para un 39,8 % (44/113).⁽³⁾

Por su parte, Rodríguez y cols., en el año 2022, en el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la provincia Camagüey, analizan el estado clínico epidemiológico de 90 pacientes con diagnóstico confirmado de la enfermedad, durante el decenio 2011-2020. Estos autores encuentran un predominio del grupo de edades entre los 40 a 49 años, con 25,6 % (23/90), seguido de el de 60 años y más, con 15,5 % (14/90).⁽⁹¹⁾

De igual manera, en Holguín, Pupo y cols., en el año 2022, encuentran que los grupos de edades con mayor número de afectados por leptospirosis se corresponden con la población laboral activa entre los 31 y 40 años, lo que representa un 39,29 % (11/28), lo que a su vez lo asocian con las actividades laborales de mayor riesgo de contraer leptospirosis.⁽⁹⁰⁾

González y cols., en el año 2021, en Colombia, describen que la mediana de edad es de 33 años, en una población de 105 casos con leptospirosis (2017 y 2018), a los cuales se les estudian las características clínico-demográficas.⁽⁷⁸⁾

Núñez y su grupo de trabajo, en República Dominicana (2022) detectan que la mayoría de los 69 pacientes notificados con leptospirosis, son menores de 49 años, lo que representa el 79,4 % (55/69).⁽⁹²⁾

Rubbo y cols., en el 2018, en la República de África Central, hallan un predominio de edades en menores de los 19 años [62,8 %(312/497)]. Este hallazgo se justifica de forma principal por el deficiente nivel socio-económico que tiene esta región geográfica, y que hace que menores de edad estén realizando actividades con riesgo, que favorezcan la adquisición de la infección.⁽³⁸⁾

En la tabla 3 se representa la distribución, según el nivel de escolaridad, en los 34 casos con leptospirosis, de La Habana entre los años del 2018 al 2021. En líneas generales, dentro de las variables precisadas prevaleció el nivel de preuniversitario con un 20%, seguido del nivel de primaria con un 15%. Los niveles de secundaria básica, universitario y técnico - profesional mostraron los menores porcentajes (9 %; 6 % y 3 %, respectivamente). En un 47 % (16/34) de los casos no pudo precisar el análisis de esta variable, por no disponer de la información requerida.

Tabla 3. Distribución, según el nivel de escolaridad, de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

Variable		Porcentaje % (n/N)
Nivel de escolaridad	Primaria	15 (5/34)
	Secundaria básica	9 (3/34)
	Técnica y profesional	3 (1/34)
	Preuniversitario	20 (7/34)
	Universitario	6 (2/34)
	No precisado	47 (16/34)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

García y cols., en el 2013, en Guatemala, analizan la seroprevalencia de leptospirosis humana en un asentamiento del área urbana de la ciudad capital. Estos autores, encuentran en el 44,0 %, (52/119) la presencia de anticuerpos contra *Leptospira*, y de forma coincidente el dato de que los casos tienen una baja escolaridad o una primaria incompleta.⁽⁹⁵⁾

Alarcón y cols., en el año 2014, en Guatemala, realizan una investigación con el objetivo de estimar la seroprevalencia de leptospirosis en agricultores dedicados al cultivo de arroz, del valle del Alto Mayo, región San Martín, de ese país, e identificar anticuerpos producidos contra los serovares circulantes y analizan los factores asociados a la infección. Estos autores, encuentran que solo el 38,8 % (100/254) de la data en estudio, logran el nivel secundaria o superior. ⁽⁹⁶⁾

En Paraguay, López y cols., en el año 2015, analizan la seroprevalencia de leptospirosis y factores asociados en trabajadores del servicio de aseo urbano de la Municipalidad de Asunción. Los resultados del estudio demuestran que el 27,4 % (93/339) de los trabajadores cuentan con un nivel de escolaridad de primaria completa y el 25,1 % (85/339) secundaria incompleta. ⁽⁹⁷⁾

En el estudio que en 2021 realizan Zambrano y cols., en Ecuador, con el objetivo de identificar factores de riesgo potenciales ante la leptospirosis porcina como zoonosis en porcicultores y trabajadores del Matadero del Cantón, hallan que el nivel educativo predominante es el de secundaria terminada con el 71,96 % (77/107). ⁽⁹³⁾

A juicio de la autora, los resultados de esta investigación, difieren de los revisados en la literatura internacional. Estas diferencias se deben a que en Cuba la educación es un derecho de todas las personas y constituye una responsabilidad del Estado y la familia, los que garantizan en conjunto, los servicios de educación gratuitos, asequibles y de calidad para la formación integral, desde la primera infancia y hasta la enseñanza universitaria de postgrado. Esta realidad determina que el nivel de escolaridad de nuestros habitantes sea superior al de la mayoría de los países de América Latina y al de muchos del mundo.

La tabla 4 revela la distribución, según la actividad laboral (categorías), de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana entre el año 2018 el 2021. Como se observa, las variables de actividad laboral asociadas con y sin riesgo representaron un 50 %, respectivamente. Al analizar las categorías con riesgo epidemiológico predominaron los que tuvieron contactos con animales (26 %), siguiéndole los casos que tuvieron contacto con aguas y suelos contaminados y los que hicieron actividades agropecuarias (12%, respectivamente). Mientras, que en los que no tuvieron riesgo epidemiológico y precisaron su actividad laboral, prevaleció ser funcionario político (6 %), siguiéndole las amas de casa, jubilados y cuentapropistas, con un 3 % cada uno. En un 35 % de los

casos estudiados, no se pudo realizar el análisis de esta variable, por no contar con la información requerida.

Tabla 4. Distribución según la actividad laboral de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021)

Variable		Porcentaje % (n/N)	Categorías	Porcentaje % (n/N)
Actividad laboral	Con riesgo	50 (17/34)	Contacto con animals	26 (9/34)
			Actividades agropecuarias	12 (4/34)
			Contacto con aguas y suelos	12 (4/34)
	Sin riesgo	50 (17/34)	Jubilado	3 (1/34)
			Ama de casa	3 (1/34)
			Funcionario político	6 (2/34)
			Cuentapropista	3 (1/34)
			No refiere	35 (12/34)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Díaz y cols., en Pinar del Río, en el año 2018 plantean que dentro de los posibles riesgos epidemiológicos, prevalecen los que cultivan arroz con el 76,1 % (86/113), seguido de los que crían cerdos y perros con muy poca diferencia entre ellos 62,8 % (71/113) y 57,5 % (65/113), respectivamente.⁽³⁾

Otra investigación que se realiza en Cuba, en el año 2022, por Pupo y cols., en Holguín, comenta que de 28 pacientes ingresados con el diagnóstico de leptospirosis en el Hospital Clínico Quirúrgico “Lucia Iñiguez Landín” en el año 2018, once son trabajadores agrícolas, representando el 39,29% (11/28) de la data de estudio.⁽⁹⁰⁾

De igual manera Rodríguez y cols., en Camagüey (2022), encuentran que de 90 pacientes con diagnóstico confirmado de leptospirosis entre 2011 y 2020, la mayoría realiza labores que los expone a la enfermedad de forma permanente. De hecho, ellos hallan que el 80 % (72/90) cría animales domésticos, se baña o pesca en aguas potencialmente contaminadas y/o se exponen a roedores. Es interesante señalar que, según los investigadores, a pesar del alto grado de exposición en la población objeto del estudio, el 85,6 % no se encuentra inmunizado con la vacuna específica antileptospirósica, lo que sugiere que existe una deficiente labor de prevención, sobre todo en el municipio Camagüey, que presenta mayor número de pacientes.⁽⁹¹⁾

Cedano y cols., en el año 2019 analizan pacientes graves, en Cali, Colombia. Ellos encuentran que ciertos grupos de poblaciones tienen mayor riesgo de exposición debido a su trabajo en actividades agrícolas o en la manipulación de animales o de sus derivados (trabajadores de mataderos, militares, médicos veterinarios y auxiliares de clínicas veterinarias, ordeñadores en granjas de ganado y agricultores). Estos autores hallan que el 81 % (70/87) de los pacientes estudiados reportan contacto con animales, el 26 % (23/87) con perros, el 20 % (17/87) con gatos, el 16 % (14/87) con roedores, y un porcentaje menor con ganado bovino 3,5 % (3/87), y equino o porcino (2/87) con un 2,3 %, cada uno. La fuente principal de agua en la mayoría de los casos es de acueducto 40,2 % (35/87) y solo el 2 % (2/87) reporta inundación reciente. ⁽⁴⁾

En Colombia, González y cols., en el año 2021, plantean que la ocupación más reportada es oficios varios, correspondiente a 38 casos [36,19% (38/105)], seguido del trabajo en el sector agropecuario [33/105 (31,43%)]. Además, ellos contemplan en su investigación que el 79,81 % (83/105) refirieron haber tenido algún contacto con animales, y que, en particular, el 43,81 % (46/105) lo tiene con roedores. La disponibilidad del agua a través del acueducto es del 81,73 % (85/105) en los individuos que enfermaron. ⁽⁷⁸⁾

Otro ejemplo, es el estudio en Ecuador de Zambrano y su equipo de trabajo (2021) quienes encuentran que las amas de casa representan el 28,03 % (30/107) de los afectados en su investigación, seguidos de los agricultores [19,62 % (21/107)] y los ganaderos y porcicultores [10,28 % (11/107)]. ⁽⁹³⁾

De manera general, los resultados de los trabajos revisados se asemejan a los que se obtienen en esta investigación debido a que se describe que las personas que tienen mayor riesgo de enfermar de leptospirosis son aquellas que trabajan con animales o en exteriores, seguidos de los que dentro de sus actividades recreativas incluyen la inmersión en aguas estancadas o de curso lento como lagunas, presas, ríos de agua dulce y otras. ⁽⁶⁸⁾

En la tabla 5 se refleja la estadía hospitalaria de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 a 2021). Los principales resultados arrojaron que el 56 % (19/34) de estos casos presentaron una estadía hospitalaria superior a los 7 días.

Tabla 5. Estadía hospitalaria de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021)

Variable		Porcentaje % (n/N)
Estadía hospitalaria	≤ 7 días	44 (15/34)
	>7 días	56 (19/34)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Cao y cols., en el año 2004, en Cuba, describen el comportamiento de la leptospirosis grave en 35 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos del Instituto de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto." Ellos encuentran que el promedio de estadía hospitalaria es de 15,8 días en pacientes con complicaciones, contra 6,8 días en pacientes con formas no graves de la enfermedad. ⁽⁷⁾

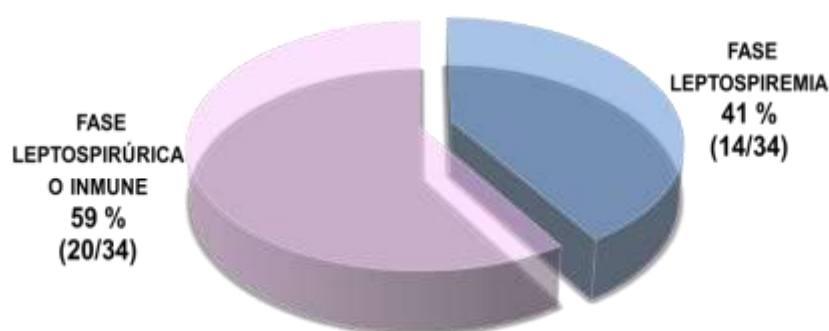
En Colombia, Mosquera y cols., en una investigación que se publica en el 2013, donde se analizan las historias clínicas de catorce casos de leptospirosis notificados entre enero de 2010 y julio de 2012, encuentran que la hospitalización promedio de los pacientes en sala general es de 7 días, y en la unidad de cuidado intensivo de 6 días, para luego pasar a salas de cuidados menos exigentes. ⁽⁹⁸⁾ En este mismo país, Cedano y cols., en el 2019, reportan que en Cali de 87 pacientes que se atienden en hospitales, la mediana de estancia hospitalaria es de seis días en las salas de hospitalización general (rango intercuartílico, RI=4-9,5), y, de cinco días en la unidad de cuidados intensivos (RI=3-13). ⁽⁴⁾

Por último, otro estudio que se publica en el 2020 por Vázquez y cols., en Santo Domingo, República Dominicana, donde analizan las características clínico socio demográficas utilizadas como predictores de mal pronóstico en pacientes hospitalizados con leptospirosis, en el Hospital Marcelino Vélez Santana, durante los años 2016-2019, enfatiza que del total de 29 pacientes estudiados el 51,7 % tienen una estadía hospitalaria de uno a siete días, con un promedio general de 4 días. ⁽⁹⁹⁾ Resultado que no coincide con nuestros hallazgos.

El tiempo de estadía hospitalaria es un parámetro que utilizan algunos investigadores para predecir la evolución del paciente. Esta variable depende de la presentación clínica (no grave o grave) que se presente, ya que si bien los individuos que cursan por formas

menos complicadas recibirán antimicrobianos parenterales hasta por siete días, en el caso de la aparición de complicaciones, asociadas en su mayoría a fallos orgánicos, se requieren cuidados en unidades intensivas, donde el paciente puede adquirir, además, una infección nosocomial.

La figura 2 representa la distribución de las fases clínicas de la leptospirosis en los 34 casos de La Habana (2018 a 2021). Como se puede observar la fase Leptospirúrica e Inmune prevaleció para un 59 % (20/34) y la fase de Leptospiremia solo alcanzó un 41 % (14/34).



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 2. Distribución de las fases clínicas en los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

Con respecto a este tema, en el año 2007, Vanasco y cols., en Argentina, analizan 1 077 muestras de suero procedentes de 812 pacientes con sospecha de leptospirosis, recibidas en el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la ciudad de Santa Fe, Argentina, entre 1999 y 2005. De ellos, fueron confirmados 267 pacientes [116 en la primera etapa (44 %), 118 en la segunda (45 %) y 33 en la tercera (11 %)]. Para cada paciente, se completó una planilla clínico-epidemiológica con los datos personales, la fecha de inicio de los síntomas, la fecha de toma de muestras, los síntomas clínicos, los datos generales de laboratorio clínico y los datos epidemiológicos en el momento de la derivación de la muestra. De las diferencias entre la fecha de la toma de muestra y la fecha de inicio de los síntomas se obtuvieron los tiempos de evolución de la enfermedad relacionados con cada muestra; a partir de estos datos, las muestras se agruparon según tres etapas: primera (menos de 10 días de evolución), segunda (de 10 a 25 días de evolución) y tercera (más de 25 días de evolución). A diferencia de lo que sucede en nuestra investigación, Vanasco encuentra que la mayoría de los indi-

viduos de su data de estudio se encontraban cursando por la fase leptospirúrica e inmune.⁽¹⁰⁰⁾

Como se conoce, poder delimitar la fase por la que cursa el paciente es fundamental para interpretar los síntomas y signos que se van presentando en correspondencia con la fisiopatogenia de la enfermedad y de ese modo tomar las decisiones terapéuticas correctas. Además, resulta indispensable para determinar las muestras clínicas útiles y las técnicas microbiológicas que se les aplicarán para lograr la confirmación de la infección por *Leptospira* spp.

Los resultados de nuestra investigación preocupan debido a que muestran que en el periodo analizado, en la capital del país, la mayoría de los pacientes fueron diagnosticados luego de una semana de evolución clínica. Esto puede deberse a que los individuos enfermos no acudieran a los servicios sanitarios por pocos conocimientos y percepción de riesgo, o porque los médicos de asistencia no sospecharan oportunamente la enfermedad. Lo que indica que estarían fallando las acciones de prevención y promoción de salud, así como el pensamiento clínico acertado.

La figura 3 representa la distribución de las formas clínicas principales de la leptospirosis en los 34 casos de La Habana (2018-2021). Nótese que no hubo diferenciación entre las formas principales establecidas, ambas mostraron un 50 % de prevalencia (17/34).



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 3. Distribución de las formas clínicas en los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2022).

En el año 2004 Valle y cols., realizan una investigación en Pinar del Río con el objetivo de definir una propuesta prospectiva de intervención educativa, según riesgos de leptospirosis definidos en el municipio Guane. Ellos encuentran que de 448 pacientes con

diagnóstico de leptospirosis humana (por clínica, evidencia epidemiológica de exposición y resultados del laboratorio) del 80-90 % evolucionan en una forma anictérica benigna, y del 10-20 % como leptospirosis grave con ictericia e insuficiencia renal. ⁽¹⁰¹⁾

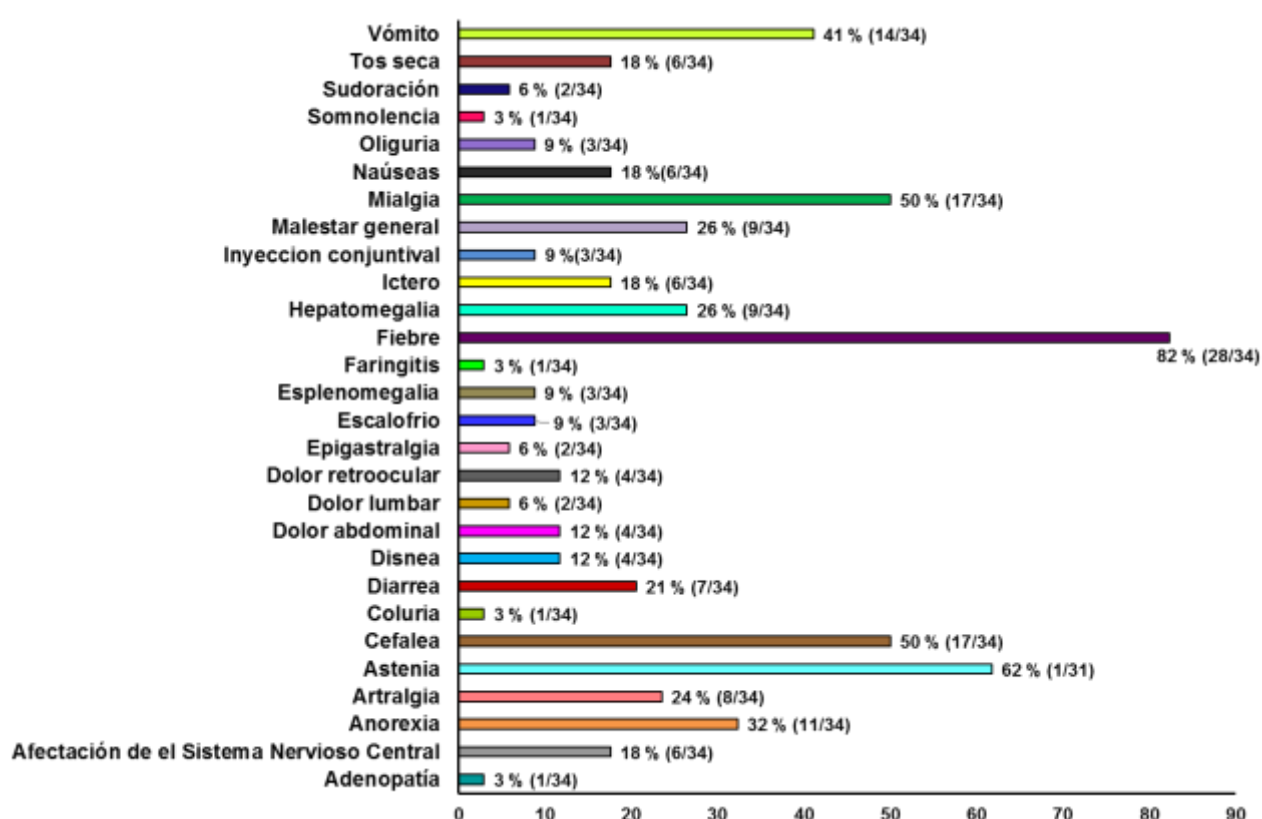
De igual modo, en Santiago de Cuba, en el 2009, Suárez estudia 145 pacientes con leptospirosis ingresados en el Hospital General Docente “Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso” durante el 2005, y encuentra que del total de pacientes estudiados el 70,3 % (102/145) cursan por la forma anictérica de la enfermedad y el resto [43/145 (29,7%)] por la ictérica. ⁽¹⁰²⁾

En Venezuela, Cardona y cols., en el año 2008 exponen que el total de los pacientes incluidos en su estudio presentan la forma ictérica de la enfermedad. ⁽¹⁰³⁾ Por su parte, Seijo y cols., en el año 2011 en Argentina, realizan un artículo con el objetivo de comunicar los hallazgos epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico de la neumonía y hemorragia pulmonar por leptospirosis, en el período de enero del 2007 a octubre del 2009, y destacan que la forma anictérica la presenta el 65 % (20/31) de los pacientes, mientras que la ictérica el 35 % (11/31) de ellos. ⁽¹⁰⁴⁾

En un estudio realizado por Mosquera y cols. en Colombia (2013), donde se analizan las historias clínicas de catorce casos de leptospirosis, durante enero de 2010 y julio de 2012, ellos encuentran que las formas severas de la leptospirosis se observan entre el 5% y 10% de todos los pacientes. Entre estas formas se destacan el síndrome de Weil y otras afectaciones sistémicas como las pulmonares y las hematológicas. ⁽⁹⁸⁾ En ese mismo país, pero en el año 2019, Cedano y cols., informan que el 17% (15/87) de los casos estudiados presentan enfermedad de Weil (ictericia, lesión renal con oliguria, síndrome de reacción inflamatoria sistémica y manifestaciones hemorrágicas), requiriendo asistencia respiratoria mecánica en la unidad de cuidados intensivos. ⁽⁴⁾

Sin embargo, resulta interesante, el hallazgo de Willis en el 2021 en Perú quien reporta una presentación clínica inusual, en la cual el paciente inicia la enfermedad de manera insidiosa, la cual concuerda con la variante no grave o asintomática. Sin embargo, luego presenta múltiples disfunciones orgánicas (respiratoria, neurológica, renal y hepático), llegando hasta la hemorragia alveolar pasando por periodos de hipercapnea severa y hemodiálisis, lo cual coincide con la forma ictérica –hemorrágica (Síndrome de Weil), la que se presenta de forma súbita y no insidiosa como lo es en este paciente. Además, en la evolución no presenta ictericia marcada ni elevación de bilirrubinas. ⁽⁶⁹⁾

La figura 4 incluye los signos y síntomas que presentaron los 34 pacientes diagnosticados con leptospirosis en La Habana (2018-2021). Véase que la fiebre predominó en los casos estudiados, para un 82 % (28/34), seguido de la astenia con un 62 % (21/34) y las mialgias y la cefalea con un 50 % (17/34), respectivamente. Otros síntomas y signos destacados fueron, los vómitos con un 41 % (14/34), la anorexia con 32 % (11/34), así como el malestar general y la hepatomegalia con 26 %, cada uno (9/34). Los restantes síntomas y signos que aparecieron en esta data de estudio se ubican por debajo del 25 %.



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 4. Síntomas y signos presentes en los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

En el año 2018, Díaz y cols. en Pinar del Río, Cuba, exponen que los principales síntomas presentados en los pacientes incluidos en su estudio son la fiebre elevada, las mialgias y las artralgias, que se manifiestan en el 100% de los enfermos, seguido de la cefalea en el 88,5 % y la astenia y anorexia en el 80,5% de los mismos .⁽³⁾

Rodríguez y cols., en Camagüey el año 2022, encuentran que de 90 pacientes con diagnóstico confirmado en el período 2011-2020, la fiebre, la cefalea, las artralgias y las

mialgias son los síntomas de mayor prevalencia en los casos de leptospirosis. Entre los signos clínicos, el íctero con 13,5 % y la hepatomegalia con 11,1 % son los más frecuentes entre sus estudiados. ⁽⁹¹⁾ En ese mismo año, pero en la provincia de Holguín, Pupo y cols., destacan que en 28 pacientes confirmados por estudios serológicos específicos para leptospirosis, encuentran como síntomas predominantes la fiebre y las mialgias, presentes en el 100 % de los casos, seguido por la cefalea en 26 enfermos (92,86 %). De igual manera el signo clínico más frecuente detectado en el examen físico es la inyección conjuntival con el 78,57 % (22/28).⁽⁹⁰⁾

Por su parte, Ortíz y cols., en el estudio que realizan en el 2011 en Nicaragua encuentran que en ambas formas clínicas de la enfermedad y en ambas fases se presentan síntomas que son compatibles con los encontrados en nuestro estudio, como son la fiebre, que constituye un patrón común. Sin embargo, ellos reportan otros síntomas y signos que difieren de los obtenidos en nuestra investigación. ⁽¹⁰⁵⁾

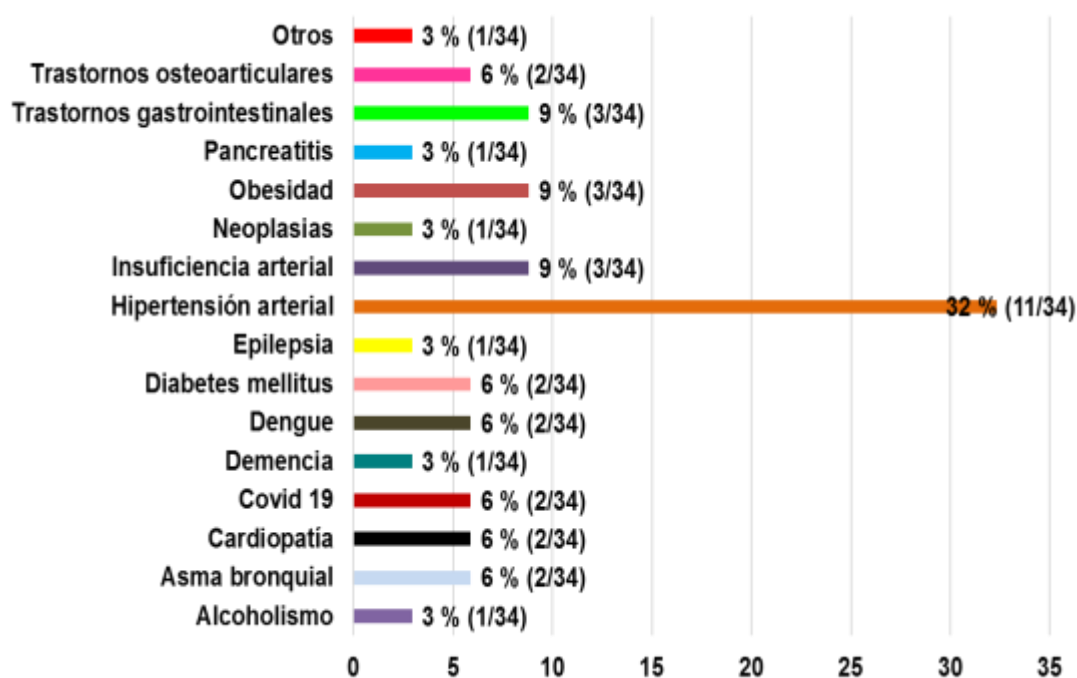
Sandoval y cols., en México, en el 2018 de 34 muestras de suero de pacientes sintomáticos, colectadas en centros de salud del estado de Sonora, en el periodo de junio-diciembre del 2009, hallan que los síntomas clínicos más frecuentes referidos por los pacientes confirmados o probables casos de leptospirosis son la fiebre, la cefalea, y el dolor muscular presentes en el 100% de los casos, la artralgia en el 90% y la diarrea o dolor abdominal en el 50%. ⁽⁷⁶⁾

Asimismo, Cedano y cols., en el 2019, en una investigación sobre pacientes graves en Cali, Colombia, notan que en 87 pacientes estudiados, los síntomas más frecuentes son: fiebre (85 %), náuseas (67 %), astenia (49 %), mialgias (57 %), artralgias (64 %), dolor abdominal (52 %) y diarrea (35 %). Ellos refieren que las manifestaciones pulmonares son más comunes en adultos (20 %), la fiebre (92 %), las náuseas y dolor abdominal, (con 71 % cada uno) en menores de 18 años, así como la diarrea (64 %), en los niños.⁽⁴⁾

Por último, González y cols., en el 2021 en Cali, Colombia analizan una data de 105 pacientes con leptospirosis y plantean que los síntomas prevalentes son la fiebre en el 92,38 % de los casos y las mialgias en el 73,33 %, seguidos de la cefalea y la ictericia con el 31%, así como de la hepatomegalia con el 12%.⁽⁷⁸⁾

Los principales antecedentes patológicos personales (APP) de los 34 casos con leptospirosis, de La Habana (2018-2021) se muestran en la figura 5. Se puede observar que el 32 % (11/34) de los casos padecían de hipertensión arterial y el 9 % (3/34) eran indivi-

duos obesos, o con trastornos gastrointestinales o con insuficiencia arterial, respectivamente. La data de estudio reflejó que el 6 % de los pacientes (2/34) presentaron trastornos osteoarticulares, o diabetes mellitus, o dengue, o Covid-19, que son cardiópatas o que sufren asma bronquial. Dentro de este marco, la detección de pacientes con pancreatitis, neoplasias, epilepsia, demencia y alcoholismo asociadas a la infección por leptospirosis, constituyó solo el 3 % (1/34) en la investigación.



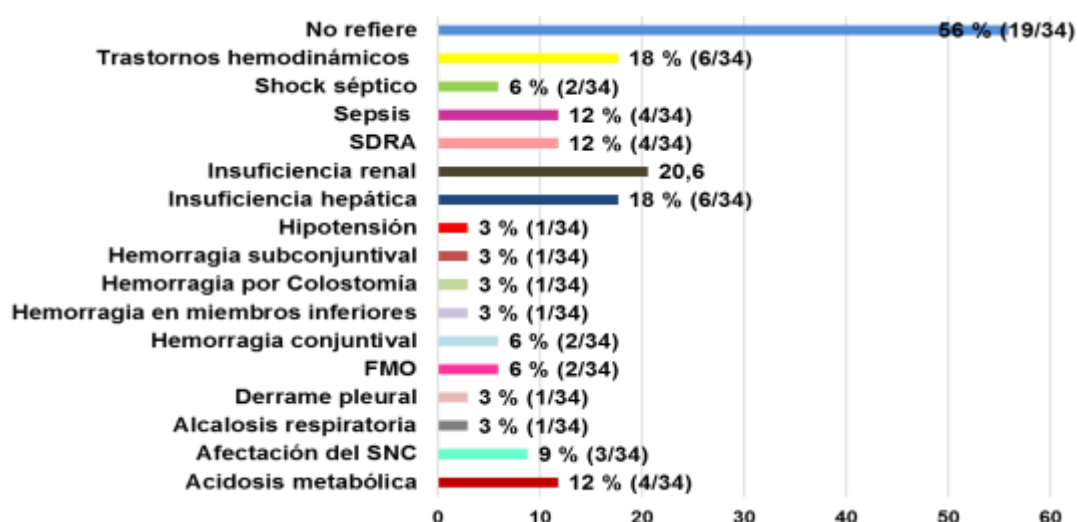
Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 5. Antecedentes patológicos personales de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

Con relación a este tema, que es poco explorado en la literatura consultada, en el estudio que realizan en Colombia (2019) Cedano y cols., encuentran que el 35 % (30/87) de los pacientes que transitan por las formas graves de leptospirosis padecen de alguna enfermedad crónica, siendo las más comunes la hipertensión arterial sistémica (16 %) y la diabetes (9 %), en tanto que, en menor proporción, se reporta el hipotiroidismo (6 %), la falla renal crónica (4 %), el cáncer (2 %) y la cardiopatía (2 %).⁽⁴⁾

La importancia de conocer las enfermedades crónicas no transmisibles o agudas transmisibles que haya sufrido el paciente, radica en que permite estimar su posible evolución tórpida a formas graves y complicadas, debido a que muchas de esas entidades traen consigo alteraciones inmunológicas que así lo propician.

La figura 6 refleja las complicaciones más frecuentes asociadas en los 34 casos con leptospirosis de La Habana (2018-2021). Afortunadamente en el 56% (19/34) no se refieren complicaciones manifiestas durante el curso de la infección por leptospiras. Sin embargo, un 21% de los casos transitaron con insuficiencia renal, siguiéndole un 18% (6/34) con trastornos hemodinámicos e insuficiencia hepática. Las restantes complicaciones encontradas no representan cifras significativas desde el punto de vista experimental.



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 6. Complicaciones más frecuentes aparecidas en los 34 casos con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

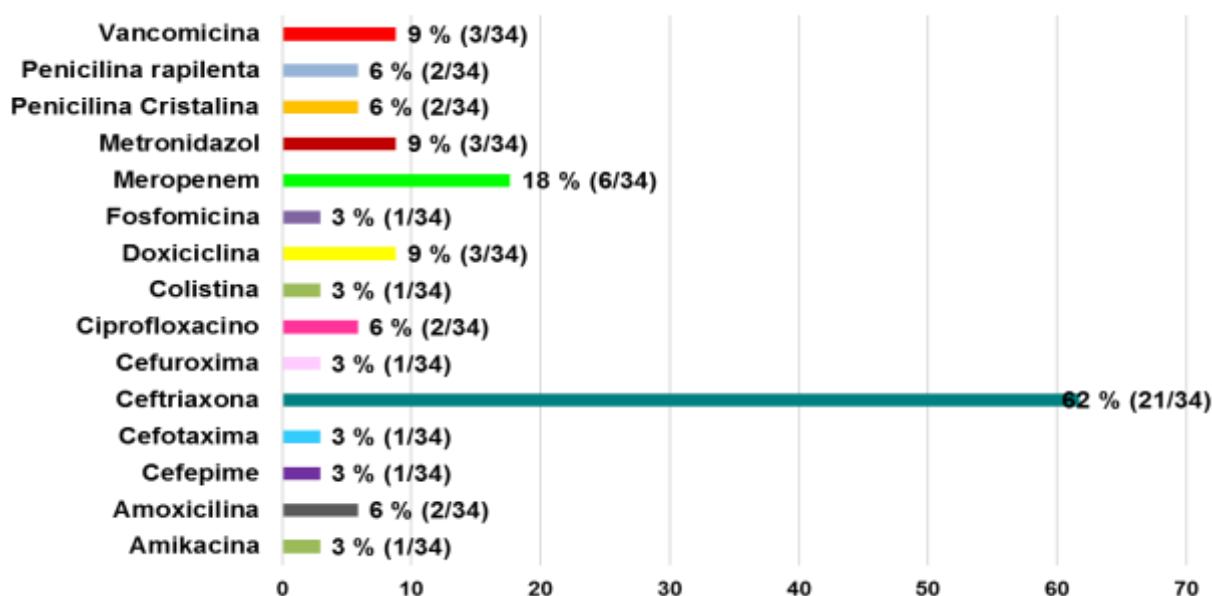
Suárez, en el año 2009, en Santiago de Cuba, realiza un estudio en 145 pacientes con leptospirosis ingresados en el Hospital General Docente “Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso”, y encuentra que las complicaciones presentadas son, insuficiencia renal aguda [12,4 % (18/145)], seguida por el síndrome de dificultad respiratoria del adulto [7,5 % (11/145)] la falla hemodinámica [7,5 % (11/145)], hemorragias [6,9 % (10/145)] y coma [6,9 % (10/145)].⁽¹⁰²⁾

En un estudio realizado por Díaz en Pinar del Río, en el 2018, reportan que son poco frecuentes las complicaciones de la leptospirosis humana presentadas, siendo la insuficiencia hepática aguda la que predomina con solo 2 casos, lo que representa el 1,8 %, seguidas por un caso de insuficiencia renal aguda y de hemorragia gastrointestinal para un 0,9 % (1/113), respectivamente. ⁽³⁾

Cedano y cols., en el 2019 en Colombia encuentran que en 87 pacientes estudiados las complicaciones hemorrágicas, como sangrado gastrointestinal (hematemesis o melenas) y epistaxis la presentan el 13% (11/87) de los adultos. Se reporta, además, hematuria en cinco pacientes y sangrado gastrointestinal en cuatro de ellos. ⁽⁴⁾

Las complicaciones en el curso de la enfermedad por *Leptospira* spp. deben ser reconocidas y tratadas con prontitud, porque en su mayoría se asocian a fallos orgánicos. La literatura recoge que el diagnóstico tardío y la no imposición del tratamiento adecuado son determinantes para que los pacientes transiten a formas graves. Además, el fallo multiórgánico determina que la mortalidad se eleve hasta aproximadamente un 20 %.

La relación de los antimicrobianos que fueron aplicados en los 34 casos diagnosticados con leptospirosis en La Habana (2018-2021), se muestran en la figura 7. Nótese que la ceftriaxona fue la terapia antibiótica más administrada a estos pacientes para un 62 % (21/34). No obstante, destacan el uso del meropenem con un 18 % (6/34), así como de la vancomicina y metronidazol , con el 9% (3/34). Las penicilinas rapilenta y cristalina, la ciprofloxacina y la amoxicilina alcanzaron el 6% (2/34), respectivamente, mientras que la fosfomicina, la colistina, la cefuroxima, la cefotaxima, el cefepime y la amikacina, representaron el 3% (1/34) de las terapéuticas antimicrobianas utilizadas.



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 7. Antimicrobianos utilizados en los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 - 2021).

En un estudio realizado en Tailandia, conducido por Panaphut , en el año 2003 se constatan los esquemas más utilizados para el tratamiento de la leptospirosis grave, concluyéndose que la administración de ceftriaxona (1 g/día) comparada con penicilina G (1,5-4 millones cada 6 h) tienen la misma efectividad, en cuanto a la desaparición temprana de los síntomas, la disminución de los tiempos de estancia hospitalaria, la aparición de complicaciones asociadas con la enfermedad y la mortalidad. Estos investigadores plantean que aunque los gastos con ambos medicamentos son similares, la forma de administración de la ceftriaxona (una sola vez al día, sin necesidad de bomba de infusión), determina que se convierta quizá en la opción más cómoda para utilizar en estos pacientes. La recomendación en cuanto a duración del tratamiento es de siete días, y se espera una respuesta clínica favorable a partir del tercer día.⁽¹⁰⁶⁾

Díaz y cols. (2018) en Pinar del Río, Cuba, encuentran que en su data de estudio la mayoría de los pacientes son tratados con Penicilina G, para un 67,2 %, reportando una respuesta favorable a la terapéutica protocolizada, y refiriendo como otros antimicrobianos a la Ceftriaxona (22 %) y a Doxiciclina (10,06 %).⁽³⁾

Por su parte, Cedano y cols. (2019) en Colombia enfatizan que en el grupo de estudio de pacientes graves que formaron parte de su investigación, los antimicrobianos más usados para el tratamiento de la leptospirosis son Ceftriaxona y Doxiciclina.⁽⁴⁾

Sin embargo, no siempre resulta fácil que el paciente responda adecuadamente a las terapéuticas establecidas. Un caso interesante al respecto es que reportan Merino y cols., en España (2021). Ellos exponen el caso de un paciente masculino de 34 años con diagnóstico de leptospirosis que acude a urgencias por mialgias presentando una tórpid evolución en las siguientes horas, por lo que se decide administrar sueroterapia y tratamiento antibiótico empírico con ceftriaxona 1 gramo intravenoso. Luego de realizar hemocultivos y urocultivos, se amplía la cobertura antibiótica con Meropenem ajustada a función renal, pero su tórpid evolución determina que se amplíe al uso de la levofloxacino y teicoplanina.⁽¹⁰⁷⁾

La figura 8, representa la distribución temporo-espacial de los 34 casos con leptospirosis de La Habana (2018-2021). Nótese que 9 de los 15 municipios capitalinos aportaron casos en este periodo. Según las estadísticas, los casos de La Lisa representaron el mayor porcentaje con un 12% (4/34), seguido por los municipios de Boyeros y Playa, los que aportaron un 9 % (3/34), cada uno, y continuándole los de Diez de Octubre, Arroyo

Naranja y San Miguel del Padrón con un 6 % (2/34), respectivamente. Sin embargo, del 44% (15/34) del total de pacientes no se pudo conocer su procedencia, o habían enfermado estando de visita en la capital. Este hecho determina que el análisis de distribución temporo-espacial de estos pacientes no pueda ser concluyente. No obstante, la mayoría de los casos positivos residen en los municipios periféricos de la capital, lo que indica, que en estas zonas agropecuarias puedan estar circulando las leptospiras con un alto potencial de transmisión.



Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Figura 8. Distribución temporo-espacial de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018-2021).

En un estudio realizado por Cao y cols., en La Habana, en el año 2004, se describe la presentación de leptospirosis grave en 35 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos del Instituto de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto." Ellos encuentran que según el lugar de residencia, 21 pacientes (60 %) viven en zonas urbanas y 14 (40%) en áreas rurales, con diferencias significativas $p < 0,05$. En la zona urbana 14 pacientes sobreviven (64 %) y siete fallecen (33,6 %), mientras que en la zona rural todos los pacientes logran sobrevivir. ⁽⁷⁾

Por otra parte, en una investigación realizada en el año 2017 en Villa Clara, Bastida y cols., analizan el 100 % de los pacientes notificados como confirmados de leptospirosis en dicho municipio durante el período comprendido desde el año 2001 al 2014. Ellos

encuentran que la mayor parte de los casos pertenecen al área de salud Policlínico Roberto Fleites, la cual abarca un universo tanto rural como urbano .⁽¹⁰⁸⁾

Seijo y cols., en el 2011, en Argentina, en los datos epidemiológicos recogidos refieren el estudio de dos matrimonios, uno residente en la ciudad de Buenos Aires y otro en la provincia de Buenos Aires, los cuales desarrollaron un cuadro grave de leptospirosis, de manera simultánea en ambos cónyuges. Los investigadores comentan que el primer matrimonio pertenece a una zona de muy buena urbanización y de buen nivel socioeconómico (Villa Urquiza), mientras que el segundo procede de una zona de bajos recursos económicos y mala urbanización (La Matanza), por lo que ellos no consideran que existe más riesgo de enfermar por vivir en áreas rurales u urbanizadas. ⁽¹⁰⁴⁾

González y cols., en Colombia, en el 2021, con el objetivo de describir las características socio- demográficas y el cumplimiento del proceso de notificación de los casos sospechosos de leptospirosis remitidos al laboratorio departamental de salud pública del Valle del Cauca, realizan una investigación entre 2017 y 2018 reportando que el 70,19% (73/105) de los pacientes residen en zona urbana. ⁽⁷⁸⁾

En la tabla 6 se observan los resultados de las técnicas serológicas para la confirmación del diagnóstico, utilizando 30 sueros de pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según intervalo de FIS con respecto a la FTM. Obsérvese, en primer lugar que, no se trabajaron los 30 sueros por todas las técnicas serológicas, porque estas se utilizaron en diferentes momentos de acuerdo a su disponibilidad en el laboratorio. Se puede notar también que el mayor porcentaje de serologías realizadas se obtuvo por el sistema SD Leptospira IgM-IgG, método recomendado por los expertos en leptospirosis, solo para la pesquisa de la infección. Sin embargo, por el mismo, solo cinco sueros fueron positivos (17 %), y de ellos dos muestras fueron confirmadas serológicamente, una por HAT y la otra por MAT, mientras que de las restantes tres, una fue confirmada por HAT y dos fueron positivas por la PCR. También hay que destacar que, fueron superiores los resultados obtenidos por SD Leptospira, ELISA-IgM y por MAT, ambas técnicas con un 100% de positividad, a pesar de la baja cantidad de muestras estudiadas. Por último, la técnica de HAT mostró un comportamiento esperado al confirmar cuatro muestras de las seis estudiadas, lo que representó el 67%.

Tomando en consideración los intervalos entre FIS y FTM, según la positividad por técnicas serológicas utilizadas, se destaca que siete muestras positivas por las

diferentes técnicas, fueron obtenidas durante el sexto o séptimo día, del curso clínico de la infección. Otros siete sueros positivos, fueron obtenidos con un intervalo igual o superior a los ocho días. Este hallazgo sugiere que el momento ideal de extracción del suero para ser aplicado por las diferentes técnicas serológicas en el diagnóstico de leptospirosis, es a partir del sexto o séptimo día de evolución clínica del paciente (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de las técnicas serológicas en 30 sueros, de pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según intervalo de FIS con respecto a la FTM.

Intervalos FIS – FTM (días)	Total de sueros usados N=30			
	Muestras trabajadas, según técnica			
	SD Leptospira IgM-IgG	SD Leptospira ELISA IgM	HAT N=6	MAT N=1
	Porcentaje - % (muestras positivas/total muestras clínicas trabajadas)			
1 – 5	-	-	-	-
Hasta 7	7 (2/30)	50 (2/4)	33 (2/6)	100 (1/1)
≥ 8	10 (3/30)	50 (2/4)	33 (2/6)	-

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Duany y cols., en Cienfuegos, Cuba, en el año 2014 encuentran que la HAT tiene una positividad de 57% (47/83) en sueros pares, valor similar al que se obtiene en nuestra investigación.⁽⁴⁾ De igual manera, en el año 2021 Obregón y cols., en ese mismo país, realizan un estudio donde encuentran que la técnica serológica ELISA IgM, tiene mayor utilidad y positividad [46% (43/93)] en muestras tomadas entre el quinto y octavo día de evolución de la enfermedad.⁽¹⁰⁹⁾

Por otra parte, Vanasco y cols. (2007), al analizar en la ciudad de Santa Fé, Argentina, 1 077 muestras de 812 pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), entre 1999 y 2005, utilizan como criterio de definición de casos los resultados de la MAT, los antecedentes de laboratorio clínico general, los síntomas y los datos epidemiológicos. Ellos consideran “casos confirmados” los pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos indicativos de leptospirosis, en los que se demuestra la seroconversión en la MAT (aumento del título

de por lo menos cuatro veces para una serovariedad) en dos o más muestras con al menos una semana de intervalo, o la existencia de una única muestra positiva para más de una serovariedad (coaglutinación), siempre que una de ellas exista un título mayor o igual a 1/200 en la MAT. ⁽¹⁰⁰⁾

En cuanto a las ventajas y desventajas de las técnicas diagnósticas, Ortiz y cols., encuentran en su estudio realizado en el 2011 en Nicaragua, que el SD Leptospira IgM-IgG es rápido, sencillo y económico. Sus desventajas radican en tener una baja especificidad. Asimismo, Leptospira ELISA IgM es reproducible, detecta anticuerpos IgM en etapas tempranas (infección activa), pero tiene la desventaja de producir reacciones cruzadas débiles, además de no indicar el serovar infectante. ⁽¹⁰⁵⁾

Por otro lado, la HAT es un método rápido que usa antígenos género específicos, pero su desventaja es que utiliza sueros pares que no siempre se pueden obtener, la inestabilidad del antígeno y la no capacidad de indicar el serovar que produce el proceso agudo. Por su parte La MAT utiliza un panel de leptospiros que representan todos los serogrupos descritos en la región en cuestión. Esta prueba tiene alta especificidad y detecta serogrupo y serovar infectante. Su desventaja es que es laboriosa, consume tiempo y que hay que disponer del panel de cepas vivas de leptospiros. ⁽¹¹⁰⁾

García y cols., en Guatemala en el año 2013, encuentran que de 119 pobladores que cumplen con los criterios de inclusión establecidos, en el 32,7 %, se obtiene una frecuencia de anticuerpos IgG anti-Leptospira por la prueba ELISA, mientras que para la prueba de referencia MAT el resultado resulta de 30,3 %; representando una estimación de la prevalencia en la población entre el 22,2 y 39,3 % (IC95%) para esta última prueba. ⁽⁹⁵⁾

En un estudio citado por Abgueuen, en Francia, en el 2014, se refieren a que las técnicas serológicas como la MAT y ELISA IgM tienen mayor utilidad después del séptimo día de evolución del cuadro clínico, mientras que la PCR es útil en todas las fases de la enfermedad. ⁽¹¹⁰⁾ En ese mismo año Alarcón y cols., analizan la seroprevalencia de leptospirosis y características asociadas en agricultores de arroz de una región tropical del Perú. Ellos reportan que la seroprevalencia en esta población mediante la prueba MAT es de 64,6% (168/260) con una variación entre 58,6 a 70,6% (IC 95%). En el caso de la positividad por la prueba ELISA, se encuentran 39 casos con anticuerpos IgM anti-Leptospira (15,0%, IC 95%: 10,5-19,5%). De manera general, el porcentaje de positivos

a ELISA IgM es significativamente mayor entre los que fueron reactivos a MAT, comparada con los que no lo fueron (20,8% frente a 4,3%, $p<0,01$). Estos autores no hallan diferencias significativas en la seroprevalencia de sintomáticos y no sintomáticos con MAT (60,0 % frente a 65,3 %, $p=0,54$), ni con ELISA IgM (14,3 % frente a 15,1 %, $p=0,95$).⁽⁹⁶⁾

En el año 2018, Sandoval y cols., en México, estudian 34 muestras de suero de pacientes sintomáticos colectadas en centros de salud del estado de Sonora, en el periodo de junio-diciembre del 2009, las cuales fueron tomadas durante los primeros 7 días de iniciados los síntomas.⁽⁷⁶⁾

González y cols., en el 2021, encuentran que de 256 registros de casos sospechosos de leptospirosis ocurridos en el Valle del Cauca, Colombia, 106 (41,4 %) tienen prueba de ELISA positiva en el periodo comprendido.⁽⁷⁸⁾

En Holanda, Goris y cols., en el año 2022, evidencian que las técnicas serológicas tienen mayor utilidad cuando las muestras son colectadas a partir del día diez de evolución de la enfermedad.⁽¹¹¹⁾

A juicio de la autora, los métodos serológicos confirmatorios, en Cuba, resultan útiles en muestras extraídas antes del séptimo día de evolución clínica. Este resultado avala el uso continuo de estas herramientas, ya sea empleando un simple suero o muestras pares de los casos sospechosos de leptospirosis.

En la tabla 7 se muestran los resultados de las 31 muestras clínicas (sueros, sangre total y orinas) de los pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), mediante la aplicación de la PCR LipL32 a punto final, según intervalo de FIS con respecto a la FTM. Nótese en primer lugar que, no se trabajaron las mismas cantidades de muestras clínicas por cada paciente en estudio. Sin embargo, si se pudieron diagnosticar tempranamente siete muestras de sueros, extraídos antes del quinto día de la evolución de la enfermedad, lo que representó el 32 % de positividad, aunque, el mayor porcentaje se obtuvo en muestras extraídas después del sexto día de la infección. En este segundo grupo de muestras clínicas positivas, como muestra la tabla, cuatro sueros (18 %) y una sangre (14 %), se extrajeron entre del sexto al séptimo día de evolución clínica de la enfermedad, mientras que 11 sueros (50 %), seis sangres totales (86 %) y dos orinas (100 %) fueron colectadas después del octavo día.

Tabla 7. Resultados de la PCR LipL32 a punto final, en las 31 muestras clínicas (sueros, sangre total y orinas) de los pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según intervalo de FIS con respecto a la FTM.

Total muestras clínicas positivas por PCR n=31			
Intervalos de FIS – FTM (días)	Muestras trabajadas		
	Sueros n=22	Sangre total n=7	Orinas n=2
	Porcentaje (muestras positivas por PCR LipL32/tipo de muestra clínica trabajada)		
1 – 5	32 (7/22)	-	-
Hasta 7	18 (4/22)	14 (1/7)	-
≥ 8	50 (11/22)	86 (6/7)	100 (2/2)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Rodríguez y cols., en el año 2013 en un estudio que se realiza en Cuba, plantean que tres casos dan positivos al aplicar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y resultan negativos por los métodos serológicos.⁽¹¹²⁾ A su vez, Noda y cols., también en Cuba, en el 2014, encuentran que la PCR constituye una alternativa valiosa para la confirmación de leptospirosis en casos humanos fatales, en los que no se presenta un resultado serológico positivo, ya sea por falta de muestra de suero o por un nivel significativo de anticuerpos.⁽¹¹³⁾

Engelber & Goris y cols., en los años 2009 y 2020, en Holanda, encuentran que, la sensibilidad de la técnica de PCR es mayor cuando se aplican muestras clínicas extraídas durante los primeros cinco días de inicio de la enfermedad.^(111, 114)

Ganoza y cols., en una investigación realizada en Perú, en el año 2010, confirman el 5,9 % (6/102) de las orinas (mediante la PCR), de personas asintomáticas, residentes en un área endémica de leptospirosis.⁽⁵³⁾

De esta investigación se desprende, que la PCR es una técnica valiosa, en nuestras condiciones, y en particular para el diagnóstico temprano de la enfermedad. De igual manera, se considera, que la herramienta molecular, es aplicable a las tres muestras clínicas (sangre total, suero y orina) que se utilizan de rutina para el abordaje de laboratorio. Estas ventajas le proporcionan a la tecnología, sea elegida fundamentalmente para el diagnóstico confirmatorio de leptospirosis. Por ello, y nuestro juicio, las tecnologías

de genes son eficaces en cualquiera de las fases de la enfermedad, con énfasis en los que son serológicamente negativos durante los primeros siete días del proceso patológico, lo que resalta la necesidad de mantener la actualización de los algoritmos técnicos en Cuba.

La tabla 8, representa el porcentaje de confirmación serológico-molecular usando los sueros, la sangre total, las orinas o combinaciones entre ellas, de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según fases clínicas de la enfermedad e intervalo de FIS/FTM. Véase que dentro de la fase leptospirémica se confirmaron 14 pacientes lo que representó el 41 %. Dentro de estos, siete pacientes se positivizan tempranamente, a través del uso de los sueros extraídos entre el primero y quinto día de evolución clínica, mientras que los restantes siete pacientes lo hicieron entre el sexto o séptimo día, de ellos seis, se confirmaron usando el suero y uno con el uso combinado del suero y la sangre total positivas. Dentro de la fase leptospirúrica e inmune, se confirmaron 20 casos para un 59 %, todos tenían muestras extraídas a partir del octavo día. De igual manera, 14 casos fueron positivos al usar sus sueros lo que alcanzó el 41 %, cuatro casos con la sangre total para un 12 % y dos casos tenían las tres muestras clínicas positivas (suero, sangre total y orina) lo que representó el 6 %.

Tabla 8. Porcentaje de confirmación serológico-molecular usando los sueros, la sangre total, las orinas o combinaciones entre ellas, en los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según fases clínicas de la enfermedad e intervalo de FIS/FTM.

Fases Clínicas Porcentaje (total pacientes positivos/total de pacientes)	Intervalo FIS – FTM (días)	Muestras clínicas Porcentaje (pacientes confirmados/total de pacientes)			
		Sueros	Sangre total	Suero + Sangre total	Sueros + Sangre total + Orinas
Leptospiremia 41 (14/34)	1 - 5	20 (7/34)	-	-	-
	Hasta 7	18 (6/34)	-	3 (1/34)	-
Leptospirúrica e inmune 59 (20/34)	≥ 8	41 (14/34)	12 (4/34)	-	6 (2/34)

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio.

Ortíz y cols., en Nicaragua, en el año 2011, encuentran en su investigación que en ambas formas y fases clínicas de la leptospirosis hay muestras que son más útiles que otras. Estos autores consideran que tanto en la forma anictérica como en la ictérica y en particular durante el periodo de bacteriemia, es la sangre total la muestra idónea para el diagnóstico de esta entidad clínica. De igual manera, describen que el suero es útil también en cualquiera de las fases clínicas de la leptospirosis y la orina tiene mayor importancia en la fase leptospirúrica.⁽¹⁰⁵⁾

Goris y cols., en el 2020, en Holanda, plantean que la orina resulta una muestra útil para el diagnóstico temprano por PCR de la leptospirosis. De igual forma, otros autores holandeses también estudian el valor que tiene esta muestra clínica para el diagnóstico rápido de la enfermedad.⁽¹¹¹⁾

A consideración de la autora, en nuestro medio, han sido muy escasos los pacientes que se confirman molecularmente a través de la orina, como muestra clínica. Más bien, ésta es empleada para realizar cultivos de la bacteria, lo que también tiene un irrefutable valor epidemiológico. En otras palabras, tanto para la leptospirosis aguda y convaleciente, continúa siendo la opción adecuada el uso no solo del suero, sino también la sangre total y la orina, especímenes de los que se obtiene un porcentaje elevado de positividad, lo que respalda la renovación de las guías de laboratorio para este diagnóstico en los laboratorios cubanos.

La tabla 9 representa la confirmación serológica-molecular de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según fases clínicas de la enfermedad e intervalo de FIS/FTM. Nótese que dentro de los 14 pacientes que cursaban por la fase clínica de leptospiremia, fueron confirmados el 64 % (9/14) molecularmente por la PCR a punto final, solo tres son confirmados por la serología lo que representó el 21 % mientras que solo un suero resultó confirmado serológica y molecularmente para un 7 %. Las muestras de estos casos fueron extraídas desde el primer y hasta el séptimo día de evolución clínica. En cuanto a los 20 pacientes que cursaban por la fase leptospirúrica e inmune (59 %), se observó que el 80 % (16/20) se confirmaron molecularmente por la PCR a punto final y el 20 % (4/20) a través de técnicas serológicas. Estas muestras fueron extraídas después del octavo día de evolución clínica. En este sentido, se observó un mayor número de pacientes confirmados por el método molecular de la PCR a punto final,

lo que habla a favor de su alta especificidad y sensibilidad, aún en las primeras etapas de la enfermedad.

Tabla 9. Porcentaje de confirmación serológico-molecular usando los sueros, la sangre total, las orinas o combinaciones entre ellas, de los 34 pacientes con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), según fases clínicas de la enfermedad e intervalo de FIS/FTM.

Fases Clínicas Porcentaje (total pacientes positivos/total de pacientes)	Intervalo FIS – FTM (días)	Método confirmatorio Porcentaje (número de pacientes positivos, según métodos utilizados/ total de los pacientes que cursaban por cada fase clínica)		
		Serológico	Molecular	Serológico + Molecular
Leptospiremia 41 (14/34)	1 - 5	-	50 (7/14)	-
	Hasta 7	21 (3/14)	21 (3/14)	7 (1/14)
Leptospirúrica e inmune 59 (20/34)	≥ 8	20 (4/20)	80 (16/20)	-

Fuente: Historias clínicas y/o remisión para estudio de laboratorio

Goris y cols., en Holanda, en el 2022 en su investigación demuestran que el diagnóstico serológico y molecular se complementan combinadamente, para la confirmación de la leptospirosis. Estos autores evidencian que, el éxito de la confirmación depende del momento de extracción y tipo de muestra que se elija, y además que la PCR tiene mayor utilidad en muestras colectadas entre el primer y el cuarto día, o sea durante la fase leptospirémica. Cabe señalar que, el diagnóstico por PCR es útil en la fase aguda (fase de leptospiremia), pero también lo es en las muestras extraídas durante la fase de leptospiruria o inmune.⁽¹¹¹⁾

A juicio de la autora, los resultados de la tesis demuestran que la combinación de métodos serológicos y moleculares, continúa siendo la opción adecuada, para la confirmación de laboratorio de los casos con leptospirosis aguda y convaleciente en Cuba, lo que facilita la disponibilidad de herramientas para de definición final de cada caso en estudio. Afortunadamente, en nuestras condiciones los algoritmos disponibles imbrican métodos serológicos y moleculares capaces de captar con la mayor sensibilidad diagnóstica, la

presencia de *Leptospira* spp. o sus productos en las muestras clínicas de los casos sospechosos.

Conclusiones

- Los principales factores socio-demográficos, clínicos y epidemiológicos de los casos con leptospirosis de La Habana (2018 – 2021), se corresponden, en su mayoría, con los reportes científicos consultados, aunque se observa un ligero incremento de los que son diagnosticados con complicaciones, de forma tardía, lo que sugiere replantear las políticas de salud con respecto a esta entidad clínica en la capital cubana.
- La distribución temporo-espacial de los pacientes con leptospirosis de La Habana, no es concluyente, por no poder precisar, en todos, la procedencia exacta, no obstante, la mayoría de los casos positivos residen en los municipios periféricos de la capital, lo que indica, que en estas zonas agropecuarias puedan estar circulando las leptospiras con un alto potencial de transmisión.
- Se constata en la investigación que, los métodos serológicos confirmatorios para leptospirosis en Cuba, resultan útiles en muestras extraídas a partir del antes del séptimo día de evolución clínica, mientras que las tecnologías de genes son eficaces en muestras extraídas en cualquier momento del proceso patológico, con énfasis en los que son casos serológicamente negativos, lo que resalta la necesidad de mantener la actualización de los algoritmos técnicos, para conocer la real circulación de *Leptospira* spp.
- Los resultados de la tesis, demuestran que, la combinación de métodos serológicos y moleculares, para la confirmación de leptospirosis aguda y convaleciente, continúan siendo la opción adecuada, para los laboratorios de la red nacional de microbiología, lo que respalda la renovación de las guías de laboratorio para este diagnóstico en Cuba.

Recomendaciones

- Coordinar con el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología, así como con los hospitales de La Habana, el envío de las muestras clínicas de los casos graves sospechosos de leptospirosis, con la información clínica y epidemiológica pertinente, lo que facilitaría la mejor interpretación de los resultados y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Extender la investigación a otros territorios del país, con el objetivo de actualizar la magnitud del problema que provoca el aumento del envío de muestras clínicas al LNRL-IPK procedentes de casos graves y sospechosos de leptospirosis y así eliminar la brecha entre positividad vs caso notificado por el Programa de Zoonosis de la DNE.

Bibliografía

1. Duany Badell L, Achón García M, Varen Álvarez A, Badell Taquechel E, Morales Pérez N, Bolaños Valladares T. Aspectos clínicos y epidemiológicos de pacientes con leptospirosis en Cienfuegos. 2001 - 2010. MediSur [Internet].2014[citado 8 Jun 2021];12(4):601-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2014000400005&nrm=iso.
2. Obregón Fuentes AM. Avances de laboratorio sobre la leptospirosis humana en Cuba, 1989-2016. Rev Cubana Med Trop [Internet].2017[citado 15 Jun 2021];69(3):1-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300013&nrm=iso.
3. Díaz Alfonso H, Acosta Falero Y, Lorenzo Díaz JC, Lazo Herrera LA, Ordóñez Álvarez LY. Caracterización clínica, epidemiológica y terapéutica de pacientes hospitalizados con leptospirosis humana. 2018 [Internet].2018[citado 16 Jul 2021];9(2):10. Disponible en: <http://www.revtecnologia.sld.cu/index.php/tec/article/view/1112>.
4. Cedano J, Rodríguez S, Kujundzic W, Arana JS, Pacheco R, Rosso F. Caracterización clínica de la leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali, Colombia, 2010-2016. Biomédica [Internet].2019;39(Supl 1):108-16. Disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3985>.
5. Organización Panamericana de la Salud[Internet].Leptospirosis. Washington, D.C.: OPS; 2021; [actualizado 2022; citado 3 en 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leptospirosis>.
6. Bautista B, Bulla Castañeda D, López Zootec H, Díaz A, Pulido M. Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. Rev Colombiana Cienc Anim RECIA [Internet].2019[citado 16 Jul 2021];11(2):108-18. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2027-42972019000200108&nrm=iso.
7. 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 [Internet].2004[citado 16 Jul 2021];43(4):13. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232004000400004&nrm=iso.
8. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Cuba. 2018 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud;2019[citado 17 jul 2021]; Available from: <https://files.sld.cu/bvscuba/files/2019/04/Anuario-Electr%3b3nico-Espa%3b3l-2018-ed-2019-compressed.pdf>.
9. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Cuba. 2019 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud;2020[citado 19 Jul 2021]; Available from: <https://files.sld.cu/bvscuba/files/2020/05/Anuario-Electr%3b3nico-Espa%3b3l-2019-ed-2020.pdf>.
10. Hernández Cabezas M, García Franco V, Mauri Pérez J. Leptospirosis en humanos en el municipio Playa La Habana 2000-2010. Rev haban cienc méd [Internet].2012[citado 22 sept 2022];11(1):94-103. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2012000100012&lng=es.
11. Soler M, Mogliani S, Benítez S, Cabillón L, Rollié R, Martins G. Glucocorticoides en hemorragia alveolar por leptospira. Medicina (B Aires) [Internet].2021[citado 17 May 2022];81(1):107-10. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802021000100107&lng=es.
12. Yescas Benítez J, Rivero Perez N, Montiel Díaz H, Valladares Carranza B, Peláez Acero A, Morales Ubaldo A, et al. Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en México durante el periodo 2013-2019. Rev salud pública [Internet].2020;22(4):1-5. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rsap.v22n4.87535>.
13. García A, María A, Feraud Tercilla D. Primer reporte en Cuba de Leptospira interrogans serovar Tarassovi y caracterización clínica epizootológica en focos de Leptospirosis porcina. REDVET [Internet].2005[citado 17 May 2022];VI(4):1-34. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612647002>.
14. Valverde Latorre F, Ortega-Ramos V, Yunga-Quimi A, Zamora-Rodríguez A. Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por leptospira. Dom Cien [Internet].2021;7(4):152-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v7i6.2415>.

15. Berdasquera Corcho D, Cruz Acosta A, Rodríguez Boza E. Leptospirosis humana, una enfermedad olvidada. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet].2009[citado 17 May 2022];25(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252009000100017&lng=es.
16. Goarant C, Trueba G, Bierque E, Thibeaux R, Davis B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and Leptospirosis. Michigan State University; UNESCO; 2019.Available from: <https://doi.org/10.14321/waterpathogens>.
17. Hernández Cabezas M, Mauri Pérez JL, Vargas Yzquierdo J, Hernández Cabezas M. Leptospirosis humana: un abordaje epidemiológico desde los factores ambientales. *Revista Cubana de Medicina General Integral* [Internet].2017[citado 17 may 2022];33:129-38. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252017000100011&nrm=iso.
18. García González R, Reyes Torres A, Basilio Hernández D, Ramírez Pérez M, Rivas Sánchez B. Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Cli* [Internet].2013[citado 19 May 2022];60(1):57-70. Disponible en: www.medigraphic.com/patologiaclinica.
19. Alonso Rodríguez B, Gómez de Haz H, Cruz de la Paz R. Leptospirosis humana:¿ un problema de salud? *Rev Cubana Salud Pública* [Internet].2000[citado 17 May 2022];26(1):27-34. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21400105>.
20. Brightman C. Leptospirosis: a leisure and occupational hazard. *Trends in Urology & Men's Health* [Internet].2018; 9(1):29-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/tre.619>.
21. Hideyo N, Kligler I. Immunological studies with a strain of Leptospira isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatán. *J Exp Med* [Internet].1920;32(5):627-37. Disponible en: <https://doi.org/10.1084/jem.32.5.627>.
22. Ko A, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [Internet].2009;7(10):736-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>.
23. Grune Löffler S. Manual sobre diagnóstico molecular de leptospirosis [Internet]. Buenos Aires: Ediciones INTA;2022[citado 20 sept 2022]; 101 p.
24. T. Vincent A, Schiettekatte O, Goarant c, Kumari Neela V, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases* [Internet].2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.
25. Romero Vivas C, Falconar A. Leptospira spp. y leptospirosis humana. *Salud Uninorte* [Internet].2016[citado 20 May 2022];32(1):123-43. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81745985011>.
26. Barreto Argilagos G, Rodríguez Torrens H. Sistemática y nomenclatura actual de Leptospira. *Rev prod anim* [Internet].2018[citado 20 May 2022];30(1):66-7. Disponible en: <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/2193>.
27. Tabet Oller do Nascimento A, Verjovski Almeida S, Van Sluys M, Monteiro Vitorello C, Camargo L, Digiampietri L, et al. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. *Brazilian journal of medical and biological research* [Internet].2004[citado 25 may 2022];37(4):459-77. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/xmYbTZ54zRtJXJCQws3WMtH/?format=pdf&lang=en>.
28. Jorge S, Schmitt Kremer F, Rodrigues de Oliveira N, Sanches Valerio Navarro G, Munari Guimarães A, Domingues Sanchez C, et al. Whole-genome sequencing of Leptospira interrogans from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet].2018;113:80-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170130>
29. Carrada Bravo T. Human leptospirosis: Natural history, diagnosis and treatment. *Rev Mex Patol Clin Med Lab* [Internet].2005[citado 22 may 2022];52(4):246-56. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=4405>.
30. Baquero Parra M, Gómez A, Hernández Rodríguez P. Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de Leptospira sp. *Rev Med Vet* [Internet].2010[citado 22 may 2022](19):101-1. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100009&nrm=iso.

31. Campos Chacón N. Leptospirosis. Med leg Costa Rica [Internet].2014[citado 25 may 2022];31(2):112-8. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012&nrm=iso.
32. Evangelista K, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future microbiology [Internet].2010[citado 25 my 2022];5(9):1413-25. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037011/>.
33. Abdullah M, Kumar Chaubey K, Namdev R, Sharma R. Leptospira: A Review on Pathogenesis and Host Immune Response. Annals of RSCB [Internet].2021[citado 25 May 2022];25(5):18686 -94. Disponible en: <https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/8362>.
34. Scharrig E, Carestia A, Ferrer M, Cédola M, Pretre G, Drut R, et al. Neutrophil Extracellular Traps are Involved in the Innate Immune Response to Infection with Leptospira. PLoS neglected tropical diseases [Internet].2015;9(7):e0003927. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003927>.
35. Du P, Li S, Ojcius D, Li K, Hu W, Lin X, et al. A novel Fas-binding outer membrane protein and lipopolysaccharide of Leptospira interrogans induce macrophage apoptosis through the Fas/FasL-caspase-8/-3 pathway. Emerging microbes & infections [Internet].2018;7(1):1-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0135-9>.
36. Cagliero J, Villanueva S, Matsui M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet].2018[citado 27 may 2022];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00204>.
37. Alia S, Joseph N, Philip N, Azhari N, Garba B, Masri S, et al. Diagnostic accuracy of rapid diagnostic tests for the early detection of leptospirosis. Journal of infection and public health [Internet].2019;12(2):263-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.10.137>.
38. Rubbo Pierre A, Soupé Gilbert M, Golongba D, Mbombo F, Girault D, Nakouné E, et al. Evidence of human leptospirosis cases in a cohort of febrile patients in Bangui, Central African Republic: a retrospective study, 2012–2015. BMC Infectious Diseases [Internet].2018;18(1):1-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3298-z>.
39. Ramli S, Moreira G, Zantow J, Goris M, Nguyen V, Novoselova N, et al. Discovery of Leptospira spp. seroreactive peptides using ORFeome phage display. PLOS Neglected Tropical Diseases | [Internet].2019;13(1):e0007131. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007131>.
40. Lin X, Xiao G, Luo D, Kong L, Chen X, Sun D, et al. Chimeric epitope vaccine against Leptospira interrogans infection and induced specific immunity in guinea pigs. BMC Microbiology [Internet].2016;16(1):241. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0852-y>.
41. Ramírez García R, Agudelo Flórez P, Acevedo Sáenz L. Inmunología de la leptospirosis. CES Med [Internet].2019;33(3):192-200. Disponible en: <https://doi.org/10.21615/cesmedicina.33.3.4>.
42. Joya Chavarría L, Gutiérrez Lara D, Hurtado Méndez W, Gama Moscoso J. Leptospira: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. Biociencias [Internet].2015;10(2):65-80. Disponible en: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..2.2643>.
43. Carranza Zamora A, Chang Fonseca D, Gutierrez López Y. Leptospirosis y enfermedad de Weil. Rev méd sinerg [Internet].2020;5(3). Disponible en: <https://doi.org/10.31434/rms.v5i3.346>.
44. Sykes J, Reagan K, Nally J, Galloway R, Haake D. Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. Pathogens [Internet].2022;11(4):395. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>.
45. Torres Castro M, Hernández Betancourt S, Agudelo Flórez P. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet].2016[citado 26 may 2022];54(5):620-5. Disponible en: <http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revistamedica/article/view/486/990>.
46. Naing C, Reid S, Aye Saint N, Htet Htet N, Ambu S. Risk factors for human leptospirosis following flooding: A meta-analysis of observational studies. PloS one [Internet].2019;14(5). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217643>.

47. Kamath R, Swain S, Pattanshetty S, Nair N. Studying risk factors associated with human leptospirosis. *J Glob Infect Dis* [Internet].2014[citado 26 may 2022];6(1):3-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24741223>.
48. Monahan A, Miller I, Nally J. Leptospirosis: risks during recreational activities. *Journal of applied microbiology* [Internet].2009;107(3):707-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x>.
49. Castro Flores R. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gaceta médica de México* [Internet].2010[citado 26 may 2022];146(6):423-9. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=29843>.
50. Michel V, Branger C, Andre Fontaine G. Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* [Internet].2002[citado 26 may 2022];54(1):7-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000100002&lng=es.
51. Donaires L, Céspedes M, Sihuincha M, Pachas P. Determinantes ambientales y sociales para la reemergencia de la leptospirosis en la región amazónica del Perú, 2012. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet].2012[citado 27 may 2022];29(2):280-4. Disponible en: <https://www.scielo.org/article/rpmesp/2012.v29n2/280-284/>.
52. Velasco Castrejón O, Rivas Sánchez B, Espinoza Hernández J, Martínez Hernández E. Diagnóstico de leptospirosis crónica, comparación entre la aglutinación microscópica y 3 técnicas diagnósticas confirmatorias. *Rev Cubana Med Trop* [Internet].2007[citado 26 may 2022];59(1):0-. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100002&nrm=iso.
53. Ganoza C, Matthias M, Saito M, Céspedes M, Gotuzzo E, Vinetz J. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet].2010;4(2):e612. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612>.
54. Cosson J, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet].2014;8(6):e2902. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002902>.
55. Obregón A, Fernández C, Rodríguez I, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba. *Rev Panam Salud Publica* [Internet].2004[citado 27 may 2022];16(4):259-65. Disponible en: https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpsp/v16n4/23075.pdf.
56. Pérez Elias Y, Obregón Fuentes A, Rodríguez Reyes I, Alfonso González M. Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Rev Cub Med Mil* [Internet].2015[citado 27 may 2022];44:0-. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572015000400006&nrm=iso.
57. Aranzazu Ceballos A, Apraez Henao L, Ortiz Marín D. Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta. *Rev chil infectol* [Internet].2020;37(6):728-38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000600728>
58. Suárez Conejero A, Otero Morales J, Cruillas Miranda S, Otero Suárez M. Prevención de leptospirosis humana en la comunidad. *Rev Cub Med Mil* [Internet].2015[citado 30 may 2022];44:86-95. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572015000100010&nrm=iso.
59. Rodríguez Rodríguez V, Castro Cordero A, Calderon Rangel A, Guzman Teran C, Urango Gallego L. Leptospirosis: Epidemiología, clínica, diagnóstico y manejo.2021[citado Available from: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/4885>.
60. Abreu Ugarte J. Primeros pasos en la inmunoprofilaxis contra la leptospirosis en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet].2022[citado 30 May 2022];59(e1172). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032022000100003&nrm=iso.
61. Pérez Nellar J. Neuralgia amiotrófica posterior a la vacunación contra la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* [Internet].2013[citado 30 may 2022];65:398-402. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000300014&nrm=iso.

62. Obregón Fuentes A, Fernandez 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* [Internet].2011[citado 30 may 2022];63:239-45. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300007&nrm=iso.
63. Obregón Fuentes A, Fernández Molina C, Rodríguez González I, Rodríguez Olivera Y, Echevarría Pérez E, Rodríguez Silveira J, et al. Detección de anticuerpos IgM contra leptospiras por un sistema comercial ELISA-IgM. *Rev Cubana Med Trop* [Internet].2013[citado 30 may 2022];65(2):202-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-7602013000200007&lng=es.
64. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, M, et.al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* [Internet].2003;3(12):757-71. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309903008302>.
65. Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Rev peru med exp salud publica* [Internet].2005[citado 29 my 2022];22:290-307. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008&nrm=iso.
66. Torres Torres J, Sánchez Sánchez J, Deleg Guartá R, Poma Macía J. Síndrome de Weil, leptospirosis ictérica. 2020 [Internet].2020[citado 26 may 2022];4(1):8. Disponible en: <https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/medi/article/view?path=>.
67. Oriol López F. Tratamiento de la leptospirosis humana. *Alternativa antibiótica iMedPub Journals* [Internet].2015;11(2:2):1-6. Disponible en: www.archivosdemedicina.com.
68. CDC[Internet].Hoja de datos de Leptospirosis. Estados Unidos: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades; 2017; [actualizado 2022; citado 3 my 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/leptospirosis/es/leptospirosis-hoja-de-hechos.html>.
69. Willis Samamé J. Leptospirosis: Presentación inusual. *Rev Cuerpo Med HNAAA* [Internet].2019;11(2):119 - 21. Disponible en: <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2018.112.76>.
70. Gupta N, Wilson W, Ravindra P, Raghu R, Saravu K. Coinfection of leptospirosis and coronavirus disease 2019: A retrospective case series from a coastal region in South India. *J Med Virol* [Internet].2022. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jmv.27816>.
71. Warnasekara J, Srimantha S, Kappagoda C, Jayasundara D, Senevirathna I, Matthias M, et al. Diagnostic method-based underestimation of leptospirosis in clinical and research settings; an experience from a large prospective study in a high endemic setting. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet].2022;16(4):e0010331. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010331>.
72. Bárcena Flores L. Relación de la prevalencia y factores de riesgo de la leptospirosis en Santa Clara, Iquitos 2013. Universidad Nacional Agraria La Molina: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2018 [citado 29 may 2022]. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3205>.
73. Beltrán O. Identificación y clasificación de las rutas metabólicas de las especies de *Leptospira* spp. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2021 [citado 28 may 2022]. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80560>.
74. 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* [Internet].2007[citado 28 may 2022];59(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100003&lng=es.
75. Pérez Elías Y, Obregón Fuentes A, Lemos Pérez G, Machado Morales H. Diseño y evaluación preliminar de una prueba rápida para el diagnóstico de la leptospirosis humana. In: *Convención Internacional de salud Pública. La Habana: Cuba Salud 2018; 2018. p. 1-8.*[cited 25 my 2022]. Available from: <http://convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/view/1934>.
76. Sandoval Petris E, Avilés Acosta M, Montesinos Cisneros R, Montalvo Corral M, Tejeda Mansir A. Estudio comparativo del diagnóstico de leptospirosis mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta univ* [Internet].2018;28:50-5. Disponible en: <https://doi.org/10.15174/au.2018.1625>.

77. Martín P. Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de La Plata; 2018. Available from: <https://doi.org/10.35537/10915/67994>.
78. González Arboleda A, Pacheco R, Baena S, Palomino D, Ferro B. Subdiagnóstico de Leptospirosis en el Valle del Cauca ¿la punta del iceberg? Revista de Investigación UPNW [Internet].2021. Disponible en: <https://doi.org/10.37768/unw.rinv.10.01.005>.
79. Woods K, Nic-Fhogartaigh C, Arnold C, Boutthasavong L, Phuklia Wea. A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. Clin Microbiol Infect [Internet].2018;24(9):1017.e1-e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.017>.
80. Riediger I, Stoddard R, Ribeiro G, Nakatani S, Moreira Sea. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. PLoS Negl Trop Dis [Internet].2017;11(9):e0005940. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005940>.
81. Waggoner J, Soda E, Seibert R, Grant P, Pinsky BA. Molecular Detection of *Leptospira* in Two Returned Travelers: Higher Bacterial Load in Cerebrospinal Fluid Versus Serum or Plasma. Am J Trop Med Hyg [Internet].2015;93(2):238-40. Disponible en: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0174>.
82. Noda Ramos A, Rodríguez González I, Rodríguez Olivera Y, Govín Chávez A, Obregón Fuentes A. Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos. Rev Cubana Med Trop [Internet].2014[citado 25 sept 2022];66(3):447-52. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602014000300012&nrm=iso.
83. Obregón Fuentes A. Leptospirosis y brucelosis humana, dos zoonosis con impacto en salud pública. Abordaje de laboratorio 2016-2017. In: Salud Cid. La Habana: Cuba Salud 2018 2018. p. 1-7.[cited 18 sept 2022]. Available from: <http://convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/view/562>.
84. Soncini A. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología [Internet]. Lopardo L, Predari S, Vay C, editors. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología;2021[citado 25 my 2022]; Available from: <https://1library.co/document/yngkm331-microbiolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica-asociaci%C3%B3n-argentina-microbiolog%C3%ADa-bacterias-importancia-cl%C3%ADnica.html>.
85. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol [Internet].2011;49(6):2154-60. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/jcm.02452-10>.
86. Ospina Pinto M, Hernández Rodríguez P. Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. Rev Cubana Med Trop [Internet].2015[citado 25 may 2022];67(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602015000300011&nrm=iso.
87. Hamer M, Saraullo V, Brihuega B, Watanabe O, Martinez M, Grune L. Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. FAVE, Secc Cienc vet [Internet].2019;18(2). Disponible en: <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>.
88. Pérez Elías Y, Obregón Fuentes A, Lemos Pérez G, Machado Morales H, Rodríguez Reyes I, Rodríguez Silveira J. Evaluación de un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral para la pesquisa de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop [Internet].2015[citado 18 sept 2022];67(2). Disponible en: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/88>.
89. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Brasil: AMM;2013[citado 9 p. Available from: http://conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/Declaracion_Helsinki_Brasil.pdf
90. Pupo Micó A, Riverón Carralero W, Hernández Castellanos G, Naranjo Landares D, Santos Remón D. Caracterización clínico epidemiológica de la leptospirosis humana en el Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Íñiguez Landín”, Holguín, Cuba. Acta Médica [Internet].2022[citado 31 Ago 2022];23(1):e257. Disponible en: <http://www.revactamedica.sld.cu/index.php/act/article/view/257>.

91. Rodríguez Puga R, Pérez Díaz Y, Rodríguez Abalo O, Morales Mayo M, García González G, Abreu Guirado O. Estado clínico epidemiológico de pacientes con diagnóstico confirmado de leptospirosis. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* [Internet].2022[citado 31 Agosto 2022];59:e1228. Disponible en: <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/1228>.
92. 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* [Internet].2022;6(1):17-24. Disponible en: <https://doi.org/10.22206/cysa.2022.v6i1.pp17-24>.
93. Zambrano Gavilanes M, Lazo Pérez L, Bulnes C, Goycochea, Fimia Duarte R. Potenciales factores de riesgo ante la leptospirosis en porcicultores y trabajadores de matadero en Portoviejo, Manabí, Ecuador. *Centro Agrícola* [Internet].2021[citado 8 Sep 2022]. Disponible en: <http://cagricola.uclv.edu.cu/>.
94. Rodríguez Alonso B, Gómez de Haz H, Pérez Maza B, Cruz de la Paz R. Algunos aspectos clinicoepidemiológicos en fallecidos por leptospirosis humana en Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet].2001[citado 28 my 2022];17(1):21-6. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252001000100003&nrm=iso.
95. García Masaya M, Herrera García M, Pérez Vásquez A, Castillo Signor L, Kestler Ordóñez R. Seroprevalencia de leptospirosis humana en un asentamiento del área urbana de la ciudad de Guatemala. *Rev Cubana Med Trop* [Internet].2013[citado 5 Sep 2022];65(2):166-76. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000200003&nrm=iso.
96. Alarcón Villaverde J, Romani Romani F, Tejada Romina A, Wong Chero P, Céspedes Zambrano M. Seroprevalencia de leptospirosis y características asociadas en agricultores de arroz de una región tropical del Perú. *Rev perú med exp salud publica* [Internet].2014[citado 8 Sep 2022];31(2):195-203. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200002&nrm=iso.
97. López F, Samudio M, de Assis y Águeda Cabello D. Seroprevalencia de leptospirosis y factores asociados en trabajadores del servicio de aseo urbano de la Municipalidad de Asunción, Paraguay. *Rev chil infectol* [Internet].2015;32(6):628-33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700003>.
98. Mosquera Klinger G, Vela Lozada F, Álvarez Moreno C. Reporte de catorce casos de leptospirosis en un hospital universitario de IV nivel entre 2010 y 2012. *univ med* [Internet].2013;55(1):93-100. Disponible en: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed55-1.umbc>.
99. Vázquez López C. Características clínico socio demográficos utilizadas como predictor de mal pronóstico en pacientes hospitalizados con Leptospirosis, en el Hospital Marcelino Vélez Santana durante los años 2016-2019. . Santo Domingo: Universidad Iberoamericana; 2020 [citado 9 Sep 2022]. Available from: <http://repositorio.unibe.edu.do/jspui/handle/123456789/204>.
100. Vanasco N, Lottersberger J, Schmeling M, Gardner I, Tarabla H. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. *Rev Panam Salud Publica* [Internet].2007[citado 10 Sep 2022];21(6):388-95. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892007000500007.
101. Valle Pimienta T, Lago Díaz Y, Cabrera Prado A, Linares Medina O, Ramos Ibarra M. Epidemiología de la leptospirosis humana: propuesta de intervención educativa. *Rev Ciencias Médicas* [Internet].2004[citado 11 Sep 2022];18(4):555-65. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942014000400002&nrm=iso.
102. Suárez Olivares A. Caracterización clinicoepidemiológica de pacientes con leptospirosis. *MEDISAN* [Internet].2009;13(4). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v13n1/san04109.pdf>.
103. Cardona E M, Moros V R, López L E, Pérez C J, Hernández R. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *Rev Soc Ven Microbiol* [Internet].2008[citado 10 Sep 2022];28(1):24-30. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000100006&nrm=iso.
104. Seijo A, Romer Y, San Juan J, Prieto R, Nogueras M, De Vedia L, et al. Neumonía aguda de la comunidad y hemorragia pulmonar por leptospirosis en el área metropolitana Buenos Aires. *Medicina (B*

- Aires) [Internet].2011[citado 11 Sep 2022];71(2):127-34. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802011000200003&lng=es.
105. Ortiz Díaz J, Osorio Vanegas M, Cuadra Solórzano R, López Bonilla I. Clínica y demografía de los pacientes con leptospirosis ingresados en la sala de Medicina Interna del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello, HEODRA, de León (Reporte de casos) en el periodo octubre - noviembre 2007: UNAN-LEON; 2011. Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/5232>.
 106. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. Ceftriaxone Compared with Sodium Penicillin G for Treatment of Severe Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet].2003;36(12):1507-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/375226>.
 107. Merino Chaves J, Burzaco Sánchez A, Grau García M, Garay Hidalgo I, Azkorra Kamiruaga A, Martínez López M. Diagnóstico y manejo de leptospirosis icterohemorrágica: a propósito de un caso. *Gaceta Médica de Bilbao* [Internet].2021[citado 27 may 2022];118(2):124-7. Disponible en: <http://www.gacetamedicabilbao.eus/index.php/gacetamedicabilbao/article/view/847>.
 108. Bastida J, Osés Rodríguez R, Fimia-Duarte R, Rodríguez O, Iannacone J, Taboada B, et al. Leptospirosis y su relación con algunas variables climáticas en el municipio de Santa Clara, Villa Clara, Cuba. *Biotempo* [Internet].2017;14(1):57-69. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.31381/biotempo.v14i1.840>.
 109. Obregón A, Echevarría E, Lugo O, Soto Y, González LeaAfhwacipAav. Usefulness of IgM-ELISA test for screening of Leptospirosis in Cuba. *AJAS* [Internet].2020;8(2). Disponible en: <https://doi.org/10.24203/ajas.v8i2.6067>.
 110. Abgueguen P. Leptospirosis. *EMC - Tratado de Medicina* [Internet].2014;18(4):1-10. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(14\)69228-X](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(14)69228-X).
 111. Goris M. Diagnóstico convencional, serológico y molecular de las leptospiras. In: *Curso Internacional "Leptospirosis Habana 2022 y otras zoonosis de importancia para la salud pública"* Amsterdam. Amsterdam: Department of Medical Microbiology & Infection Prevention; 2022.
 112. 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* [Internet].2013[citado 18 Jul 2021];65(2):211-22. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000200008&nrm=iso.
 113. 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* [Internet].2014;56(4):411-15. Disponible en: <http://10.1590/S0036-466520140005000>.
 114. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PloS one* [Internet].2009;4(9):e7093. Disponible en: <http://10.1371/journal.pone.0007093>.

Anexos

Anexo 1. Modelo de solicitud de diagnóstico microbiológico.

1. Nombre(es) Primer apellido Segundo apellido			2. Carne de identidad		Nº
3. Dirección particular			4. Municipio		5. Provincia
6. Historia Clínica					
7. Edad	8. Sexo	9. Ocupación	10. Color de la piel Blanca__ Negra__ Amarilla__ Mestiza__		11. Días de ingreso
12. Centro que remite		13. Sala	14. municipio	15. Provincia	16. Fecha Día Mes Año
17. Diagnóstico clínico 20. Fecha de comienzo de los síntomas Día Mes Año			18. Tipo de muestra colectada Suero Sangre LCR Humor Acuoso Orina Líquido Amniótico Gargarismo Espudo Heces Exudado cual____ Tejido cual____ Lamina de: Cepa de: Fecha de colecta muestra Día Mes Año		1. APP Enfermedad similar en la familia o comunidad. Si____ No____ Historias de viajes al exterior Si____ No____ País Fecha de llegada al país Día Mes Año Tratamiento Previo Si____ No____ ¿Cuáles? _____
21. GENERALES Fiebre____ Mialgia____ Cefalea____ Linfadenopatía____ Malestar general____ Vómitos____ Rash____ Petequias____ Diarreas____ Artralgia____ Esplenomegalia____ Astenia____ Escalofríos____ Sangramiento____ Dolor Abdominal____ Aumento de volumen de parótida____ IRA Tos____ Disnea____ Expectoración____ Laringitis____ Faringitis____ Rinorrea____ Otitis____ Coqueluche____ Amigdalitis____ Laringotraqueobronquitis____ Estornudos____ Vacunación anti influenza____			22. Estudio Solicitado Diagnostico Referencia		

SNC Desorientación____ Rigidez Nucal____ Convulsiones____ Perdida de la conciencia____ Trastorno de la conducta____ Dificultad en la marcha____ ITS Secreción Genital____ Lesión Genital____ Sepsis Urinaria____ Disurias____ Otros: _____	23. Sueros pareados Fecha de colecta 1er Suero Día Mes Año 2do Suero Día Mes Año Confirmatorio Dengue Referencia	Antecedentes de vacunación PRS Si____ No____ Fecha Día Mes Año
24. Nombre del facultativo		

Anexo 2

Instructivo del estuche comercial: SD Leptospira IgM-IgG, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(BIO-LINE Standard Diagnostics, INC, 2021, [http://www. standardia.com](http://www.standardia.com))

Principio

La prueba SD Leptospira IgM-IgG, es un ensayo inmunocromatográfico cualitativo y diferencial que detecta anticuerpos IgG o IgM en sueros o plasma humano. Este sistema es propuesto para uso profesional y ayuda a la orientación de los diagnósticos clínicos en pacientes que presenten síntomas clínicos sugerentes de leptospirosis. El resultado obtenido por la prueba debe confirmarse por MAT o ELISA, principalmente.

SD Leptospira IgM-IgG, tiene tres líneas pre-revestidas (línea “G”(línea con anticuerpo anti IgG humano), línea “M” ”(línea con anticuerpo anti IgM humano) y línea “C” (línea control)), todas colocadas en la superficie de la membrana. La línea de control “C” es usada para indicar la validez de la técnica. Una línea con coloración púrpura en “G” o “M” puede ser visible, si existe en la muestra suficiente cantidad de anticuerpos IgG o IgM, respectivamente. Si los anticuerpos de las clases IgG o IgM, no están presentes en la muestra, no aparecerá de coloraciones en las líneas “G” o “M”.

Muestras

- Plasma: colocar la sangre total en tubo de serología (sin anticoagulantes) y centrifugar para obtener el plasma.
- Suero: colocar la sangre total en tubo de serología (sin anticoagulantes) dejar reposar por 30 min para facilitar la coagulación, y centrifugar para obtener el suero.
- Si el plasma y el suero no van a usarse de forma inmediata, refrigerar a temperatura de 2-8°C, por un período no mayor de 2 semanas. Las muestras deben llevarse a las temperaturas de 1-30°C, antes de su uso.
- El plasma y el suero con precipitados no se recomiendan usar por este método.

Materiales

1. Dispositivos de pruebas individualmente embolsados con desinfectante.
2. Diluyente del ensayo.

3. Micropipeta o capilares de 5 μ L.
4. Instrucciones para su uso.

Marcha técnica

- Adicionar 5 μ L de suero o plasma, dentro de la zona marcada con una "S".
- Adicionar cuatro gotas del diluyente dentro de la zona identificada para el.
- Incubar durante 20 min (importante no leer los resultados antes de los 20 min para evitar falsos positivos).

Lectura e interpretación de los resultados

Muestra negativa: Una línea de color púrpura en el sitio "C" únicamente.

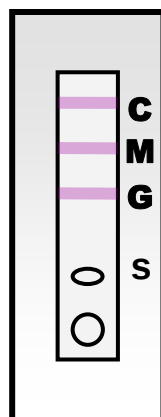
Prueba no válida: No existencia de línea color púrpura en la zona control.

Muestra Positiva:

IgG positiva: dos líneas de color púrpura (una en la zona control y otra en la zona "G").

IgM positiva: dos líneas de color púrpura (una en la zona control y otra en la zona "M").

IgG y IgM positivas: tres líneas de color púrpura (una en la zona control, otra en la zona "G" y otra en la zona "M").



Precauciones para su uso

- SD LEPTOSPIRA IgM-IgG, debe ser guardado a temperaturas de 1-300C.
- Los dispositivos de prueba son sensibles a la humedad, así como al calor e incidencia directa de la luz del sol.
- Realizar la prueba inmediatamente después de remover la tablilla de su estuche.
- No usar los estuches vencidos.
- No congelar ninguno de los componentes.
- Sistema válido para diagnóstico "in vitro".
- Usar guantes mientras se trabajan con las muestras.
- Lavarse las manos después de culminar el trabajo.
- Limpiar los derrames correctamente usando un desinfectante apropiado.
- Todos los materiales y muestras deben ser manipulados correctamente, ya que son un potencial infeccioso y deben ser eliminados al final de la prueba.

Limitaciones

Esta prueba detecta anticuerpos de IgG y/o IgM en suero y plasma, y no deben ser usados como un único criterio para el diagnóstico de leptospirosis. Los casos positivos deben ser confirmados por la técnica de referencia internacional de MAT. Como todas las pruebas de diagnóstico, los resultados deben ser considerados con las informaciones clínicas y epidemiológicas. Si el resultado de la prueba es negativo y persisten los síntomas clínicos, otras muestras deben ser estudiadas. Un resultado negativo, no debe excluir la posibilidad de una infección por *Leptospira interrogans*.

Anexo 3

Protocolo de la técnica de Microaglutinación (MAT) con antígenos vivos de leptospiras usada para el diagnóstico de leptospirosis humana

Hacer selección adecuada del panel de cepas de referencia (preferiblemente autóctonas), tomando en consideración la circulación de serogrupos en la región. Ver a continuación, las cepas de referencia recomendadas por OPS-OMS, para la región de las Américas:

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
<i>L. kirschneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	V Batavia 46
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705

<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

Hacer el protocolo por escrito (por serogrupo), en una plantilla de trabajo, que se corresponda con la cantidad de muestras y las diluciones por placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. Tomar la placa de 96 pocillos fondo plano o en U.
2. Rotular la placa con números de las muestras y serogrupo según protocolo diseñado en el punto #1.
3. Adicionar un volumen de 50 μ L de TFS (pH 7.2) a todos los pocillos
4. Adicionar un volumen de 40 μ L más de TFS (pH 7.2) sólo al primer pocillo para completar 90 μ L de TFS, como volumen final.
5. Adicionar un volumen de 10 μ L del suero puro en el primer pocillo, quedando un volumen final de 100 μ L (dilución inicial 1:10).
6. Tomar un volumen de 50 μ L del primer pocillo y pasarlo al segundo pocillo, donde ya habían servido previamente 50 μ L de TFS (ver paso 4). Homogenizar, y tomar nuevamente 50 μ L de este pocillo y pasarlo al tercer pocillo, y así sucesivamente hasta el pocillo 8 ó mas, según el estudio solicitado. Descartar 50 μ L del último pocillo. Quedando realizadas las diluciones siguientes: pocillo 1: 1/10, pocillo 2:

- 1/20, pocillo 3: 1/40, pocillo 4: 1/80, pocillo 5: 1/160, pocillo 6: 1/320, y así sucesivamente.
7. Adicionar a todos los pocillos un volumen de 50 μ L del cultivo de leptospiras del serogrupo crecido en medio liquido (EMJH) a 28°C, en fase logarítmica (concentración aproximada de 2×10^8 leptospiras/mL, equivalente a 200 células por campo). Evitar utilizar cultivos envejecidos con autoaglutinación. Quedando las diluciones finales como: pocillo 1: 1/20, pocillo 2: 1/40, pocillo 3: 1/80, pocillo 4: 1/160, pocillo 5: 1/320, pocillo 6: 1/640, y así sucesivamente.
 - a. Controles positivos y negativos:
 - b. Control de cepa: En un pocillo aparte colocar un volumen de 50 μ L de TFS y 50 μ L del cultivo del serogrupo de referencia.
 - c. Suero control positivo: En una hilera de pocillos realizar los pasos del 4 al 7, utilizando como muestra un suero con título altos de anticuerpos ($\geq 1/160$) frente al serogrupo que se evalúa en esa placa.
 - d. Suero control negativo: En una hilera de pocillos realizar los pasos del 4 al 7, utilizando como muestra un suero sin título de anticuerpos reconocidos por MAT.
 8. Homogenizar muy suavemente la placa.
 9. Incubar a 37°C por 1 hora, o de 28 – 30°C por 2 horas.
 10. Realizar la lectura resultados utilizando microscopio de contraste de fase con condensador de campo, preferiblemente con ocular de 20X y objetivo 10X. El título final del suero será la mayor dilución donde se observe el 50% de leptospiras aglutinadas y el 50% de leptospiras libres. Comparar siempre con el control de cepa.

Anexo 4

Protocolo de la Técnica de Hemoaglutinación Indirecta (HAT)

Fundamento:

Se basa en la unión del antígeno sustancia sensibilizante de eritrocitos (SSE) con anticuerpos aglutinantes específicos (clase IgM), producidos contra leptospira o sus productos. La aglutinación es indirecta. El antígeno ESS se une de forma artificial a la superficie del soporte biológico (hematíes de carnero) y espera el encuentro con el anticuerpo. Al proceso de cubrir el soporte, con el antígeno, se le conoce como sensibilización. Los hematíes de carnero resultan fáciles de obtener. Ver a continuación el fundamento esquematizado:

La reacción de hemoaglutinación dependerá del título, expresado como la máxima dilución del suero, en la que aparece el efecto biológico deseado. En particular en este caso, el efecto se traduce por la observación de mayas o enrejados de hemoaglutinación. Las mayas se expresan en función de cruces (4+, 3+, y 2+). Toda reacción de 1+ hacia abajo, se considera negativa (-). El sedimento globular del control de anticuerpos heterófilos valida el ensayo. El antígeno ESS, es género específico, de naturaleza polisacárida y se obtiene a partir de la cepa Patoc I, del serovar Patoc de la especie *Leptospira biflexa*.

La técnica, semicuantifica los niveles de anticuerpos de la clase IgM, no requiere de equipamiento sofisticado, y es rápida, ya que el tiempo de ejecución máximo es de 4,5 h. Los factores que pueden influir en el éxito de los resultados son: la concentración del soporte (eritrocitos), si ésta es alta, provocará la obtención de títulos más bajos y viceversa. El rango del pH, que debe oscilar entre 4 y 8.4, pero el óptimo es de 7.2. Otro valor de pH producirá resultados negativos. De la concentración de anticuerpos (alta concentración con respecto a la del antígeno produce efecto de prozona e inhibe la aglutinación de las diluciones bajas, debido a la unión de algunos componentes séricos con las partículas antigénicas). La concentración de antígeno, deberá ser calculada o titulada sobre la base del peso seco, o por la dilución óptima de trabajo. Si se usa una exceso de antígeno se corre el riesgo de obtener falsos biológicos positivos.

Marcha técnica:

Eritrocitos: Se utilizaron eritrocitos frescos de carneros conservados en solución de anticoagulante al 50% (ALSEVER, ver al final del texto su composición). Los eritrocitos de carneros, son lavados mediante centrifugación a 1 500 r.p.m. durante 15 min, por tres veces en TFS, pH 7.2.

Suero: El suero se diluyó 1:10 en TFS pH 7.2, y se inactivó a 56°C durante 30 min. Posteriormente se le adicionaron eritrocitos de carnero puros hasta alcanzar una concentración del 1%. La mezcla suero con eritrocitos, se colocaron en baño de agua, a 37°C por 30 min y posteriormente centrifugados a 1 500 r.p.m. por 15 min.

Sensibilización del antígeno con los eritrocitos: Se preparó suficiente cantidad del antígeno ESS, diluido en su dilución de trabajo Ej. [1:8]. Posteriormente se adicionaron eritrocitos de carnero hasta lograr alcanzar una concentración final del 1%. La reacción se incubó a 37°C durante 1h, en baño de agua. La mezcla antígeno más eritrocitos, se homogenizó cada 15 min evitando la formación de sedimentos.

Eritrocitos controles: Se preparó suficiente cantidad de eritrocitos de carnero al 1%. Estos eritrocitos también son incubados a 37°C durante 1h en baño de agua.

Marcha técnica.

1. En la placa de poliestireno de 96 pocillos y fondo en U, se depositaron 50 µL de TFS a partir del tercer hoyuelo y hasta el duodécimo. Posteriormente se adicionaron 50µL de la dilución 1: 10 del suero tratado (sólo en los 3 primeros hoyuelos).
2. A continuación se realizaron diluciones seriadas partiendo del tercer hoyuelo (dilución 1/20) hasta el duodécimo hoyuelo (dilución 1/2560), descartándose los últimos 50 uL.
3. Se depositaron después, 25 µL de eritrocitos no sensibilizados en el primer hoyuelo y 25 µL de eritrocitos sensibilizados en los restantes hoyuelos.
4. La placa se incubó a 30°C durante 1h.

Interpretación de los resultados.

Título de suero: La mayor dilución en el que se observó hemaglutinación (4+, 3+, ó 2+) (efecto biológico deseado).

Muestras pareadas:

Caso positivo: Todo paciente (estudiado con muestras pareadas) que se ajuste a los siguientes criterios:

- ❖ Seroconversión entre muestras pareadas (suero no reactivo a suero reactivo, en cualquier dilución).
- ❖ Seroconversión cuatuplicada del título del segundo suero reactivo con respecto al primero también reactivo. Es decir que el título del segundo suero reactivo, haya aumentado en al menos dos diluciones o más al título del primer suero.

Caso negativo: Todo paciente (estudiado con muestras pareadas) que se ajuste a los siguientes criterios:

- ❖ No observación de títulos, en las muestras pareadas.
- ❖ Aparición de títulos estacionarios entre las muestras pareadas.
- ❖ Disminución del título del primer suero en dos o más diluciones con respecto al primero.

Cuando se disponga de un solo suero:

Caso positivo: Todo paciente estudiado con un suero, cuyo título sea mayor o igual a 80.

Caso reactivo: Todo paciente estudiado con un suero, cuyo título fluctúe entre 10 y 40.

Caso no reactivo: Todo paciente estudiado con un suero, donde no se haya observado ningún título.

Anexo 5

Procedimiento para la extracción de ADN mediante el empleo del estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania).

Protocolo de extracción de ADN a partir del suero, sangre total y la orina:

- Atemperar las soluciones reguladoras y las muestras.
- Adicionar en el fondo de un vial de 1.5 mL, 20 µL de Proteinasa K. Utilizar tantos viales como muestras sean.
- Añadir 200 µL de la muestra en el vial donde está la Proteinasa K. Si no se cuenta con la cantidad necesaria de muestra completar con PBS hasta que se obtenga el volumen requerido.
- Añadir 200 µL de Buffer AL a la muestra y mezclar mediante vórtex por 15 seg.
- Incubar el vial a 56°C durante 10 minutos.
- Dar golpe de centrifuga para que descendan las gotas que pudieron haber quedado suspendidas en la tapa.
- Adicionar 200 µL de etanol absoluto en frío (96 – 100°C), mezclar en el vórtex durante 15 segundos y dar golpe de centrifuga.
- Transferir toda la mezcla a una columna QIAamp DNA mini kit® y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Desechar el tubo con el filtrado y colocar un nuevo tubo colector.
- Añadir 500 µL de Buffer AW1, cuidando no tocar el borde de la columna, y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Desechar el filtrado, colocar un nuevo tubo colector y adicionar 500 µL de Buffer AW2. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
- Desechar el filtrado, colocar un nuevo tubo colector y centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
- Desechar el filtrado, colocar un vial de 1.5 mL y añadir a la columna 200 µL de Buffer AE o agua bidestilada estéril.
- Incubar a temperatura de laboratorio (15 – 25 °C) durante 1 minuto y luego centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Guardar la extracción a – 20 °C hasta su uso.

PCR a punto final LipL 32, según PNO-LNRLB- 2018-2021

Se utilizó la PCR a punto final que amplificó un fragmento de 146 pb que codificó para el gen de la proteína de membrana externa LipL32 presente en todas las leptospirosis patógenas.

Extracción de ácidos nucleicos: para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre total, suero y orina, se utilizó el estuche comercial QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante recogidas en la literatura interior del estuche y disponible en <https://www.qiagen.com/>.

Secuencias de los cebadores: LipL32F 5' TAG AAT CAA GAT CCC AAA TCC TCC 3' y LipL32R 5' CCA ACA GAT GCA ACG AAA GAT CC 3'. Estos cebadores se sintetizaron en el CIGB, La Habana, Cuba.

Mezcla de reacción: cada mezcla de reacción para un volumen final de 25 µl contenía: 14,37 µL de agua libre de nucleasas; 2,5 µl de Tampón 10X PCR Top Taq; 0,5 µL de la mezcla de nucleótidos de PCR; 0,125 µL de Top Taq ADN polimerasa (QIAGEN, Alemania); 1,25 µL de cada cebador (CIGB, Cuba) y 5 µL del ADN molde. En cada ensayo de PCR se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas y como control positivo el serovar Castellonis.

Programa de amplificación: la amplificación del ADN se realizó en un termociclador Bioer (Gene Q ThermalCycler, China) que se programó con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por cuarenta segundos, hibridación a 59°C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto; a esto le siguió una extensión final a 72°C durante cinco minutos. (114)

Análisis de los productos amplificados: los productos de ADN amplificados se analizaron mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como agente intercalante y como tampón de corrida TBE al 1X. La cámara electroforética OA 110 (ElettRofoR, Italia) acoplada a la fuente de electroforesis EFD 300 (ElettRofoR, Italia), se ajustó a una diferencia de potencial de 110 V durante 30 minutos. Los amplicones se visualizaron en un fotodocumentador UVP Transilluminator (analytikjena, USA), se usó como patrón de peso molecular la escala de 100 pb (Promega, USA). Se consideró positivo la observación del amplicón a la altura de los 146 pb.

