

Avances de laboratorio sobre la leptospirosis humana en Cuba, 1989-2016

Laboratory advances about human leptospirosis in Cuba, 1989-2016

Ana Margarita Obregón Fuentes

Departamento de Bacteriología-Micología. Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIRD). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

RESUMEN

La leptospirosis humana es una enfermedad que tiene en Cuba un comportamiento endemo-epidémico con un carácter cíclico estacional. El avance tecnológico introducido en el país ha permitido tener un mejor conocimiento del agente causal en las provincias cubanas, así como realizar intervenciones en los brotes epidémicos ocurridos durante años, y brindar informaciones que fortalezcan al Programa Nacional de Prevención y Control y a los ensayos clínicos de la vacuna cubana vaxSPIRAL®. En este trabajo se resumen aspectos de interés relacionados con la vigilancia de laboratorio y los resultados de algunas de las investigaciones realizadas en el periodo 1989-2016.

Palabras clave: leptospirosis; leptospiras; diagnóstico; vacunas; serogrupos; serovares.

ABSTRACT

In Cuba human leptospirosis is a condition of an endemic-epidemic, cyclic-seasonal nature. Technological advances introduced into the country have made it possible to expand knowledge about the causal agent in Cuban provinces, carry out interventions in the epidemic outbreaks which have occurred during years, and offer information strengthening the National Prevention and Control Program and

the clinical assays for the Cuban vaccine vaxSPIRAL[®]. The paper summarizes aspects of interest related to laboratory surveillance, as well as the results of some of the studies conducted in the period 1989-2016.

Keywords: leptospirosis; leptospira; diagnosis; vaccines; serogroup; serovers.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales desatendidas y la mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes que son zoonosis, constituyen un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de las comunidades humanas empobrecidas. En la región de las Américas, se demostró que aproximadamente el 70 % de los eventos notificados al Sistema de Manejo de Eventos (EMS) son zoonosis o enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.¹

La leptospirosis afecta a millones de personas en el mundo, es considerada como una de las enfermedades "olvidadas o desatendidas", según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y también se ha asociado con el síndrome hemorrágico pulmonar y con las catástrofes atmosféricas naturales o desequilibrios ambientales. Esta entidad clínica reemergente afecta tanto a los habitantes de ambientes rurales como urbanos, en países en desarrollo como en los industrializados y tiene un comportamiento cíclico estacional relacionado con un "spill-over" de animales silvestres a animales domésticos, y aún de "spill-back" de los animales domésticos a la fauna silvestre.²⁻⁴

Desde el punto de vista clínico, la leptospirosis es una enfermedad que presenta tanto en humanos como en animales una amplia gama de signos y síntomas que la confunden con otras enfermedades infecciosas de curso agudo, tales como dengue, malaria, entre otras. Esta entidad clínica es producida por un gran número de bacterias, incluidas en el complejo patogénico *Leptospira interrogans sensu lato*.⁵

La leptospirosis humana en Cuba se reporta descriptivamente antes del año 1959. En el año 1972, se recibe en nuestro país, la primera asesoría de la OMS, a través de la Oficina Panamericana de la Salud (OPS), con el objetivo de establecer las técnicas microbiológicas confirmatorias para la leptospirosis, y seis años después (1978) se crean las condiciones para facilitar el diagnóstico serológico en todas las provincias del país, centrado por el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Entre los años 1970-1980 surgen algunos brotes epidémicos nacionales, el más significativo ocurre en la antigua provincia de Camagüey. En el quinquenio 1980-1985 los brotes que se presentan están relacionados con el trabajo agrícola en los terrenos bajos infestados por roedores, así como en los ríos, las presas, los canales y los embalses de aguas contaminadas con residuales pecuarios. En ese período se produce un incremento paulatino del número de casos, situación en correspondencia con la extensión del diagnóstico serológico confirmatorio por todo el país. En 1981 se edita en Cuba, el Programa de Prevención y Control de la Leptospirosis y en 1983 se inicia la inmunización antileptospirósica en los grupos de riesgo, con la vacuna soviética rusa compuesta por los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa y Hebdomadis.⁶

Durante el período 1988-1990 se notifican a nivel nacional un promedio de 778 casos anuales con 33 fallecidos y a partir de 1991, la mayoría de las provincias de Cuba elevan sus tasas de morbilidad, debido al incremento paulatino del deterioro de las condiciones higiénico-sanitarias y a la no inmunización con la mencionada vacuna, aplicada hasta 1987.⁷ A partir de 1989, el laboratorio de leptospiras del INHEM pasa a las instalaciones del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", y se le ratifica por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP) la denominación de Laboratorio de Referencia Nacional. Actualmente este centro se conoce como Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y *Brucella* (LNRE-B).

En 1998, se realiza un estudio descriptivo con los datos disponibles en la Dirección Nacional de Estadísticas (DNE) del MINSAP, sobre los 397 fallecidos por leptospirosis en Cuba entre 1987 y 1993, observándose un incremento brusco de la tasa de morbilidad en 1993 que alcanza un valor de 1,03 por 100 000 habitantes (en mayores de 50 años). Los meses más afectados son octubre, noviembre y junio. Las mayores tasas las reportan la Isla de la Juventud y Las Tunas. El grupo de población más afectado resulta de los jubilados, seguido de los obreros de la producción y los obreros agrícolas.⁸

En el año 1994, se reporta una tasa de incidencia nacional de 25,6/100 000 habitantes, cifra que constituye el más alto récord histórico epidémico después del período revolucionario. Por ello, se establece un plan de acción nacional emergente, el que adopta medidas que permiten a partir de ese momento, observar una reducción paulatina de la morbilidad. En 1995, se registran un total de 2 169 casos (tasa de 19,5/100 000 habitantes) y 60 fallecidos. En 1996, las cifras descienden de forma significativa, y en 1997 se notifican 1 085 enfermos (tasa de morbilidad de 9,8/100 000 habitantes) y 52 fallecidos.⁹

PAPEL DEL LNRE-B EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS DE vaxSPIRAL®

Una de las medidas tomadas por las autoridades del MINSAP de la República de Cuba en 1994, para contener el incremento de la morbilidad por leptospirosis en el territorio nacional, se lleva cabo por el Instituto Finlay (Centro de Producción - Investigación de Vacunas), donde se comienzan los estudios para la producción de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana (vaxSPIRAL®). Los resultados de la fase preclínica de esta vacuna son reportados por *González y otros*, quienes describen la formulación de variantes de vacuna de células de leptospiras inactivadas no adsorbida y adsorbida en hidróxido de aluminio y la evaluación en hámster de la inmunogenicidad, la potencia e inocuidad de los formulados. Como resultado principal, se selecciona la variante de la vacuna adsorbida, la cual demuestra ser inocua, inmunogénica y protectogénica.¹⁰

La evaluación clínica de la efectividad de vax-SPIRAL® Fase IV) se realiza en la provincia de Holguín, mediante un estudio de cohorte prospectivo *cuasi* experimental en grupos en riesgo de enfermar de leptospirosis. La efectividad de vax-SPIRAL® resulta ser del 97 %.¹¹

En 2002 se publica el ensayo clínico controlado y aleatorizado de evaluación de la reactogenicidad (Fase I) e inmunogenicidad de vax-SPIRAL® (Fase II), en grupos de voluntarios sanos. Con esta investigación se demuestra la inocuidad y la baja reactogenicidad de vax-SPIRAL® para adultos humanos.¹²

La evaluación de la eficacia de vax-SPIRAL® Fase III) reporta el 78,1 % (IC 95%: 59,2 a 88,3), con un riesgo relativo de enfermar de leptospirosis de las personas vacunadas con respecto a las personas sin vacunar del 0,22 (IC95%: 0,12 a 0,41). La vacuna cubana es eficaz, por lo que se recomienda para prevenir la enfermedad en los grupos en riesgo cubanos.¹³

El LNRE-B del IPK, estudia por el sistema ELISA cubano,¹⁴ 408 individuos vacunados con vaxSPIRAL® y 135 con placebos, incluidos en 2 ensayos clínicos (Fase I y II). En esta investigación seroconvirtieron dentro de los 38 vacunados (Fase I), 11 (29 %) por microaglutinación con antígenos vivos (MAT) y 12 (32 %) por ELISA, y de los 33 placebos, 2 (6 %) y 3 (9 %), respectivamente. En la Fase II de los 68 vacunados (dosis de 0,25 mL) y de los 65 (dosis de 0,50 mL), seroconvirtieron 21 (31 %) y 16 (25 %) por ELISA, respectivamente, por MAT 9 (13%) y 7 (11 %) individuos fueron positivos. La seroconversión por MAT, en 237 individuos vacunados con diferentes esquemas, fue de 22,4 %, sin existir diferencias significativas entre estos.⁹

Rodríguez y otros (2005) demuestran mediante un sistema ELISA cuantitativo para la detección de anticuerpos IgG contra leptospirosis, que de 930 sueros de voluntarios (483 inmunizados con vax-SPIRAL® y 447 con una vacuna contra la hepatitis B) se presenta una alta seroprevalencia de anticuerpos a los serovares vacunales antes de comenzar el estudio, y un incremento al doble del valor inicial de la respuesta a los 21 días de la segunda dosis de la vacuna, en 45 % de los individuos, existiendo diferencias marcadamente significativas ($p= 0,000000$) entre ambos grupos. Se detecta respuesta a los 3 serovares leptospirales de forma similar. Al cabo del año los niveles de anticuerpos caen, sin embargo, hay 23,1 % de individuos que logran duplicar su nivel de anticuerpos respecto al momento inicial, manteniéndose la diferencia significativa con el grupo que recibió la vacuna contra hepatitis B. Se recomienda aplicar la vacuna a los principales grupos de riesgo.¹⁵

ENFRENTAMIENTO A BROTES EPIDÉMICOS

En el mes de junio de 1997 en Villa Clara, se produce un incremento considerable de casos febriles con síntomas y signos compatibles con enfermedades como dengue hemorrágico y la leptospirosis humana. En el área afectada existían factores epidemiológicos predisponentes que hacían pensar que la enfermedad que circula es la leptospirosis humana, y que esta es la causa de las muertes reportadas por las autoridades de salud pública. El LNRE-B, organiza un algoritmo de laboratorio que incluyen técnicas directas e indirectas para confirmar la enfermedad sospechada. Dentro de los casos sospechosos, se detectan los serogrupos Ballum, Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae, como los prevalecientes. Siete casos presentan infección activa y 4 casos graves se confirman por Hemoaglutinación HAT y MAT. Tres muestras de un fallecido son reactivas por examen directo en campo oscuro y tinción de la inmunoperoxidasa. Los sueros de los fallecidos presentan títulos desde 10 y hasta 640 por HAT. Dos hemocultivos son clasificados como Ballum. Dos muestras de orina y un hemocultivo son positivos por la Reacción en Cadena de la Polimerasa a punto final. De esta forma, se ofrece una respuesta rápida a las autoridades de salud pública del territorio y se confirma que la leptospirosis es el problema de salud existente en el territorio afectado, lo que permite sugerir la aplicación de la vacuna vaxSPIRAL®, en esta población.¹⁶

La vigilancia de la leptospirosis humana desde este entonces (1998), reporta una tasa de morbilidad de $8,8/10^5$ habitantes y una letalidad de $3,7/10^5$ habitantes. Sin embargo, al inicio del año 1999, los huracanes "George" y "Mitch" provocan importantes precipitaciones e inundaciones en algunos países del Caribe y Centroamérica, lo que favorece la ocurrencia de brotes epidémicos en las provincias de Pinar del Río, Las Tunas y Ciudad de La Habana regiones donde la causa fundamental se relaciona con el contacto de roedores y con la no utilización de los medios de protección, presentándose una tasa de morbilidad de $7,5/10^5$ habitantes y una de letalidad de $5,2/10^5$ habitantes.¹⁷

En el año 2000 se reporta una tasa de morbilidad por leptospirosis humana de $4,9/100\ 000$ habitantes; en 2001 resulta de $4,8/100\ 000$ habitantes con una letalidad del $12,0/10^5$ habitantes; en 2002 de $4,9/100\ 000$ habitantes (letalidad de $13,2/100\ 000$ habitantes) y en 2003 de $4,9/100\ 000$ habitantes (letalidad de $16,4/100\ 000$ habitantes).¹⁷ No obstante, en los primeros meses de 2001, se origina en La Habana un incremento significativo del número de casos sospechosos de leptospirosis. La existencia de numerosos focos de *Aedes aegypti* conlleva al saneamiento de la ciudad, lo que provoca la modificación del hábitat de los roedores. Por ello, las autoridades del MINSAP le solicitan al LNRE-B, confirmar la etiología del problema de salud, y por ello se realiza un estudio analítico descriptivo en 264 pacientes sospechosos remitidos al Hospital IPK, de los que se confirman microbiológicamente 33 de ellos. El serogrupo prevaleciente por cultivo resulta ser Ballum, y en los sueros de los casos se encuentran: Canicola, Sejroe e Ictehamorrhagiae. La forma clínica que predomina en los casos, es la anictérica (73 %), apareciendo en orden decreciente los síntomas y signos de fiebre (88 %), cefalea (73 %), y mialgia (67 %). En estos pacientes se reportan valores elevados de bilirrubina (83,3%) y creatinfosfoquinasa (CPK) en el 67 %. El sexo más afectado es el masculino y el rango de edades predominante es desde los 15 a 44 años. El 73 % de los confirmados no está vinculado a las ocupaciones de riesgo.¹⁸

En 2004 se notifica una tasa de morbilidad de $2,7/100\ 000$ habitantes, con una letalidad de $17,0/100\ 000$ habitantes, y de nuevo, en los años 2005 y 2006, se incrementan las tasas de incidencia a $4,9/100\ 000$ habitantes respectivamente, con una letalidad de 15,9 y 12,5 en cada año. En 2005 y gracias al uso del sistema de alerta acción aplicado en las provincias de Guantánamo y Santiago de Cuba, se detecta un incremento progresivo de casos sospechosos de leptospirosis, situación que coincide con el ascenso significativo de las lluvias y las inundaciones ocasionadas por el huracán "Wilma". Las experiencias vividas en la epidemia de leptospirosis que azotó a Guantánamo durante los meses de octubre y noviembre de 2005, trae consigo que a partir de la semana estadística 42 se notificase un alza en el número de atenciones médicas con cuadros clínicos y elementos epidemiológicos de esta enfermedad. Se notifican 885 casos sospechosos y se confirman 61 microbiológicamente (6,9 %). Los municipios que mayor riesgo presentan son Niceto Pérez con una tasa de $17,9/100\ 000$ habitantes, la ciudad de Guantánamo ($13,9/100\ 000$ habitantes) y Manuel Tames ($12,9/100\ 000$ habitantes). Se acometen de forma inmediata una serie de actividades que permiten controlar la epidemia en menos de un mes.¹⁹ En los brotes epidémicos, el LNRE-B estudia las muestras clínicas de 293 pacientes sospechosos. Para el diagnóstico serológico se usan las técnicas de HAT, MAT, Lepto tek Dri-Dot, Lepto-Cuba, Látex-India, y Lepto tek Lateral Flow. Del brote I se confirman serológicamente el 26 % (22/84) de los casos, y a partir de hemocultivos el 25 % (5/20), mientras que en el brote II se confirman serológicamente 48 casos de 162 pacientes (30 %), y se obtienen los aislados de leptospiras en 6 casos de 27 procesados (22 %). Las principales serovariedades encontradas son Canicola, Ballum, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Se confirma la etiología de los dos eventos epidemiológicos, lo que favorece la toma de medidas higiénico-sanitarias en las dos provincias.²⁰

En La Habana durante los años 2001-2010, se realiza un estudio ecológico de series temporales, utilizando el alisamiento exponencial para la tendencia, el indicador único para la estratificación y la estructura territorial basada en los criterios de ordenamiento territorial; se observa que en 2002 se registra el mayor riesgo de enfermar con 4,5/100 000 habitantes. Entre 2001 y 2005, Boyeros y Cotorro se ubican en el estrato de alto riesgo. Durante 2006-2010, todos los municipios alcanzan incidencias por debajo de 3/100 000 habitantes. Según el riesgo de morir, Regla y San Miguel del Padrón se encuentran en los estratos más altos. La letalidad mostró el valor más elevado (46 %) en 2006.²¹

Posterior a este periodo la enfermedad continua con un comportamiento similar (tabla 1). Véase que en 2007 se presenta una tasa de morbilidad de 7,4/100 000 habitantes y una letalidad de 8,3/100 000 habitantes. En 2008, la tasa de morbilidad aproximada alcanzó la cifra de 2,92/100 000 habitantes,²² en 2009 de 1,50/100 000 habitantes, en 2010 fue de 1,29/100 000 habitantes, en 2011 de 2,55/100 000 habitantes, en 2012 de 2,02/100 000 habitantes, en 2013 de 2,02/100 000 habitantes, en 2014 de 2,02/100 000 habitantes, en 2015 de 0,52/100 000 habitantes, hasta llegar a 2016, donde la tasa de morbilidad es de 0,54/10⁵ habitantes, con una mortalidad de 0,28/10⁵ habitantes.²³

Tabla 1. Comportamiento de la morbilidad por leptospirosis humana y principales aportes de laboratorio. Cuba. 1993-2016

Años	Tasa de morbilidad/ /10 ⁵ habitantes	Principales aportes de laboratorio
1993	1,03	Evaluación de variante HAT (1992)
1994	25,4	Evaluación y aplicación del ELISA cubano
1995	19,5	-
1997	9,8	Detección de serogrupos Ballum, Pomona, Canicola y otros
1998	8,8	-
1999	7,5	-
2000	4,9	Evaluación de variante MAT. Confirmación de casos de Fase IV vaxSPIRAL®
2001	4,8	Detección serogrupos Ballum, Canicola, Sejroe y otros
2002	4,9	Evaluación de flujo lateral. Detección de Ballum, Pomona, y otros. Reporte de inmunogenicidad Fases I y II vaxSPIRAL®
2003	4,9	-
2004	2,7	Diseño látex cubano. Confirmación de casos de Fase III vaxSPIRAL®
2005	4,9	Detección de serogrupos Canicola Canicola, Ballum Ballum y otros
2006	4,9	Detección de serogrupos Pomona, Canicola, Ballum y otros
2007	7,4	Aplicación de la PCR para diagnóstico temprano. Detección de serovares Pomona, Ballum y otros
2008	2,92	Aplicación de la PCR para diagnóstico posmortem
2009	1,5	-
2010	1,29	-
2011	2,55	-
2012	2,02	Estudio OMPs de leptospiras
2013	2,02	Aplicación ELISA-IgM comercial
2014	2,02	Optimización de la PCR. Diseño de flujo lateral cubano
2015	0,52	-
2016	0,54	Detección de serovares Ballum, Pomona, Canicola y otros

DESARROLLO E INTRODUCCIÓN DE TECNOLOGÍAS EN EL LNRE-B Y LA RED DE LABORATORIOS CUBANOS

Durante todo este periodo también se evalúan e implementan técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad en el LNRE-B. Uno de los primeros trabajos normaliza la técnica de HAT con 414 sueros de pacientes y personal con riesgo biológico ocupacional, de los cuales 57 resultaron reactivos (14 %) y 357 negativos (86 %). A partir de esta experiencia queda esta tecnología disponible en los laboratorios de los CPHEM del país.²⁴ De igual manera, en este mismo año se realiza un estudio para el aislamiento de leptospiras en aguas, confirmándose la existencia de aislados patógenos en un 32,7 % de las muestras y clasificándose cuatro aislados como *L. biflexa* y tres como *L. interrogans*, las que pertenecen a los serogrupos Semaranga (4), Australis (2) e Icterohaemorrhagiae (1).²⁵

En 1990, *Morales Casas*, aplica la técnica de aglutinación en lámina para el serodiagnóstico de la leptospirosis humana y encuentra el 55 % de casos seropositivos, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre esta técnica y HAT.²⁶ En 1991, se producen antígenos de leptospiras para normalizar la técnica de contraelectroforesis y se logra una sensibilidad del 82 % y una especificidad del 100 %. Los antígenos de leptospiras fueron estables al menos 5 meses sin pérdida de títulos y mostraron una reactividad género-específica al detectar anticuerpos en pacientes infectados por cinco serogrupos de leptospiras.²⁷ En este mismo año, *Gil* emplea antígenos de *L. interrogans* en el diagnóstico serológico de la leptospirosis por inmunofluorescencia detectando una mayor sensibilidad (86,5 %) al usar cepas de *L. interrogans* con respecto a la sensibilidad (48 %) con cepas de *L. biflexa*.²⁸

Otro reporte del 1992, demuestra la aplicación de tres variantes serológicas de la HAT, y se observa que la variante que emplea la sangre humana formalinizada del grupo O negativo, presenta una sensibilidad del 84 %, una especificidad del 98 %, con una buena reproducibilidad y repetibilidad.²⁹

En 1993, se reporta el estudio de tres variantes de IFI para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Esta técnica muestra una sensibilidad del 80 %, y una concordancia con la HAT del 75 %. De igual manera, el tratamiento de los sueros con dos mercaptoetanol permite incrementar la sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta hasta un 100 %.³⁰

En 1994, *Tomas Abreu* estudia 500 pacientes presuntivos de leptospirosis y encuentra el 28 % de positividad serológica por hemoaglutinación indirecta. Los síntomas clínicos prevaletentes en los casos son la fiebre, cefalea y mialgias, y el antecedente laboral (78 %).³¹

En 1994, se reporta por primera vez en Cuba el uso del sistema ELISA casero, para la detección de anticuerpos totales contra leptospiras. En este estudio se determinó una coincidencia entre ELISA y MAT del 65 % (14), y en 1995, se demuestra utilizando un mayor número de sueros, una mayor coincidencia (100 %) con la MAT.³² Sin embargo, en 1996, se aplica este sistema a diferentes grupos de sueros, y se demuestra una coincidencia del 89% con la hemoaglutinación pasiva, y del 65,5 % con la MAT.³³

En 1999, se realizó la evaluación con 417 sueros, de un sistema ultramicroELISA (UMELISA) utilizando un antígeno leptospiral diluido 1:3, 1:11 y 1:21, para la detección de niveles de anticuerpos IgG producidos por la infección contra leptospirosis. El sistema propuesto mostró una sensibilidad del 90,78 %, una especificidad del 89,73 %, un valor predictivo positivo del 65,34 % y uno negativo del 97,76 %.³⁴

En 2000, se normaliza la variante técnica de MAT para el serodiagnóstico de la leptospirosis humana. Esta investigación permite el diagnóstico en individuos con bajos títulos de anticuerpos IgM e IgG, contra leptospirosis. De 190 sueros controles son positivos 49 por la MAT-V, mientras que por MAT-C son 35. La sensibilidad de la MAT-V es del 78 % y la especificidad del 89 %. Para la MAT-C son del 70 % y 100 %, respectivamente. El serogrupo Ballum es el de mayor porcentaje en los sueros de los pacientes. En 49 casos positivos por MAT-V, los títulos de anticuerpos oscilan entre 20 a 160, lo que respalda que la variante permite detectar pacientes con bajos títulos de anticuerpos a leptospirosis.³⁵

En 2004, se estudian cuatro variantes de sistemas de aglutinación con partículas de látex serovar específicos y una mezcla de ellos, para la detección de anticuerpos específicos contra leptospirosis en muestras de sueros humanos y animales. Los antígenos formalinizados pertenecientes a los serovares Canicola, Copenhageni, Mozdok, Sejroe y una mezcla entre ellos, se conjugan con partículas de látex al 3 %. Se utilizan sueros controles y de casos, comparándose con las técnicas de MAT, HAT y el sistema comercial de latex Lepto Tek Dri Dot. Se determina la reproducibilidad y estabilidad de los sistemas por un período de 6 meses. En los seis lotes antigénicos se ajustan sus concentraciones celulares entre 1,4 y 1,5 X 10⁹ cél/mL. El sistema látex-mezclado presenta valores de sensibilidad y especificidad del 94 % y 90%, respectivamente, y su comportamiento es similar al de la MAT en sueros de casos sospechosos. Todos los látex son reproducibles y un 100% estables durante 6 meses.³⁶

A partir del 2002, se reportan por el LNRE-B, los resultados de la introducción y evaluación de los primeros estuches comerciales de flujo lateral para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. El primer estudio abarca 41 sueros de pacientes en estado grave con sospechas de leptospirosis humana, los que se diagnostican mediante la prueba comercial *Lepto dipstick*, haciendo uso además de la MAT con antígenos vivos. Se obtienen diferentes niveles de reactividad por el *Lepto dipstick* en 26 de las muestras investigadas. Este ensayo y la MAT coincidieron en el 85,4 %. Se comprueba que el *Lepto dipstick* reconoce anticuerpos contra diferentes serovares de leptospirosis, lo que permite ofrecer una respuesta rápida al personal médico de asistencia.³⁷ Por su parte, Martínez y otros, realizan un estudio serológico mediante las técnicas de MAT, HAT y Lepto Tek Lateral Flow, en 40 sueros de 33 pacientes sospechosos y demuestran que 21 de ellos (52 %) fueron positivos por Lepto Tek Lateral Flow. La coincidencia entre la HAT y la MAT con respecto al sistema rápido fue del 73 % y 98 % respectivamente.³⁸

En 2009, se realiza un compendio de las investigaciones más relevantes sobre el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba, dirigido a incrementar el rigor científico del diagnóstico, a ampliar el conocimiento sobre la circulación de cepas de leptospirosis y a demostrar la utilidad e importancia de los sistemas serológicos rápidos: LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow, Lepto Tek Dri Dot y SD Leptospira IgM-IgG; los que presentan aceptables valores de sensibilidad, especificidad y concordancia. Se utilizan sistemas combinados de diagnóstico microbiológico, que identifican la etiología de la leptospirosis humana y los principales serogrupos de leptospirosis (Ballum, Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae), en los casos confirmados de brotes epidémicos ocurridos en Cuba. Además, se demuestra que los serogrupos de leptospirosis hallados en los

casos confirmados, coinciden con los presentes en *vax-SPIRAL*[®], aunque la detección de Ballum, no incluido en la formulación de esta vacuna, sugiere mantener una vigilancia activa de laboratorio, con vistas a su futura inclusión. Este trabajo describe el diseño del nuevo sistema de látex autóctono, para la pesquisa de leptospirosis humana. Este diagnosticador disponible en la red nacional de laboratorios de Cuba muestra valores aceptables de sensibilidad (93,8 %), especificidad (90,4 %) y concordancia (90,2 %) en comparación con el método de referencia. Todos los sistemas serológicos rápidos muestran amplia reactividad antigénica.^{39,40}

En 2011, se aplica en el laboratorio un sistema comercial de SD *Leptospira* ELISA-IgM de BIO-LINE Standard Diagnostics, INC, el que muestra un 15 % (16/105) de positividad y una coincidencia superior al 90 % con la MAT. El sistema fortalece el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana y la vigilancia activa de laboratorio.⁴¹

La inmunocromatografía de flujo lateral, resulta útil para el diagnóstico rápido de varias enfermedades incluyendo la leptospirosis en los humanos. Para ello, se utiliza un antígeno formado por una mezcla de células completas de leptospirosis pertenecientes a los cinco serogrupos circulantes en Cuba, para el diseño de un sistema cubano. Se evalúa la técnica con 215 sueros humanos, divididos en 75 muestras positivas (Grupo I) y 140 muestras de pacientes con serología negativa a leptospirosis (Grupo II). El sistema demuestra altos valores de sensibilidad (96 %), especificidad (97,1 %) y concordancia (96,7%), con respecto al sistema de referencia. Además, fue estable y reproducible durante los 3 meses de evaluación. Con estos resultados se impone la realización de la validación interlaboratorio e intralaboratorio, así como el registro y transferencia tecnológica de este diagnosticador.⁴²

La técnica de PCR para el diagnóstico de la leptospirosis en Cuba, se publica por Zamora y otros, en 2007, para la detección temprana de ADN de *Leptospira* spp a partir de hemocultivos de pacientes sospechosos de leptospirosis. La herramienta muestra una alta especificidad diagnóstica, lo que avala su uso para el diagnóstico temprano de la enfermedad.⁴³ Por otra parte, el diagnóstico *posmortem* de leptospirosis es laborioso. Diferentes métodos moleculares se utilizan en su confirmación, entre ellos la reacción en cadena de la polimerasa. En Cuba, desde 2008 se realiza el diagnóstico molecular de los fallecidos con sospecha de leptospirosis. En una de estas investigaciones se estudian 50 fallecidos: 3 de 2008, 7 de 2009, 15 de 2010 y 25 de 2011, de los cuales se recolectaron 171 muestras de tejidos frescos de diferentes órganos, a las que se les aplica la PCR que amplifica un fragmento del gen *lip32*. De los fallecidos, 9 disponían de un suero, utilizado para los estudios serológicos. Se confirma 32 % de los casos (16/50), correspondiendo 2 (66,7 %) a 2008, 2 (28,6 %) a 2009, 1 (6,7 %) a 2010 y 11 (44 %) a 2011. El pulmón muestra un 25 % de positividad (12/48); el hígado 25,6 % (11/43); el riñón 22,5 % (9/40); el cerebro 6,3 % (1/16); el corazón 7,1 % (1/14); el bazo 12,5 % (1/8); y el músculo 50 % (1/2). Un caso resulta positivo por serología y negativo por la reacción en cadena de la polimerasa. Otros tres casos dan positivos por reacción en cadena de la polimerasa y negativos por serología. La concordancia global entre ambos métodos es del 55,5 % (5/9).⁴⁴

Otra investigación muestra el diseño y normalización de una PCR para la detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira* spp. Mediante herramientas computacionales se verifica la eficiencia de cebadores reportados en la literatura científica y se diseñan otros que cumplieran estrictamente un conjunto de parámetros para su funcionalidad óptima. Con ellos se realiza la normalización de la PCR, ajustando variables como temperatura de hibridación y concentración de cebadores, y se determina la sensibilidad y especificidad analíticas. La PCR se evalúa en tejidos infectados artificialmente con leptospiras patógenas y se aplica a muestras de órganos frescos y embebidos en parafina de fallecidos con sospecha de leptospirosis, comparando los resultados con otras dos PCR reportadas. Se constata la falta de eficiencia teórica de los cebadores reportados en la literatura, así como la eficacia de los diseñados. La PCR normalizada con los nuevos cebadores resulta específica y más sensible que las PCR de referencia. Se demuestra la utilidad de la técnica al confirmar la infección en el 34,7 % (26/75) de las muestras de órganos frescos y 43,6 % (24/55) de los embebidos en parafina.⁴⁵ Otro reporte demuestra que la PCR detecta ADN de *Leptospira* spp. en cultivos de leptospiras de los años 2012-2013, tejidos humanos infectados artificialmente con leptospiras patógenas y en órganos frescos de fallecidos sospechosos de leptospirosis. La PCR evaluada resulta más sensible que la de referencia, y permite confirmar la infección por leptospiras en el 34,2 % (42/123) de los órganos frescos, mientras la de referencia en el 17,9 % (22/123).⁴⁶ Otra investigación realizada en 2014 muestra la comparación de los métodos de extracción del AND de las leptospiras patógenas: QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Alemania), CLART HPV kit (GENOMICA, España) y Chelex-100. El método de extracción de ADN de Chelex-100 demuestra la mayor eficiencia para la extracción del ADN en muestras clínicas.⁴⁷

INVESTIGACIONES BÁSICAS DEL LNRE-B

Otras investigaciones del LNRE-B están dirigidas al estudio de las proteínas de membrana externas (PME) de las leptospiras como potenciadoras de nuevos candidatos vacunales. En 2012 se introduce un método del Tritón X-100 para la extracción de estas proteínas en la cepa Castellon 3 (serogrupo Ballum, serovar Castellonis). Se ensayan diferentes concentraciones y se modifican las velocidades y tiempo de las reacciones. Se explora en los extractos proteicos la ocurrencia de lisis celular a través de PCR y zimografía, así como la presencia de lipopolisacáridos mediante ensayo con proteinasa K. El empleo del Tritón X-100 permite la extracción y diferenciación de las PME de leptospiras, lo que avala su novedad en la temática.⁴⁸

Las bases moleculares de la patogenia de la leptospirosis aún no están bien esclarecidas y es conocido que la presencia de proteasas juega un papel esencial en la supervivencia de las leptospiras como posible factor de virulencia. En el 2015, se realiza una metodología eficiente para la detección de la actividad proteasa y nucleasa en aislados de leptospiras. Se evalúan diez cepas de leptospira, s de ellas nueve patógenas y una no patógena. A partir de *Leptospira borgpetersenii* Ballum Castellonis se determinó el método óptimo para la extracción de proteínas totales. Se evalúan los extractos proteicos y sobrenadantes de cada cepa y se observa que el método de extracción por sonicación resulta ser el de mayor eficiencia para la extracción de proteínas totales. La actividad proteasa se presenta con un comportamiento diferente entre las cepas patógenas y la de referencia.⁴⁹

En Cuba, en 2005, se reporta un método para determinar la concentración mínima inhibitoria para las leptospiras utilizando cepas de referencia, pertenecientes al complejo patogénico *L. interrogans sensu lato* y *L. biflexa sensu lato* frente a la penicilina, la ciprofloxacina, el cloranfenicol, la rifampicina y la tetraciclina. Los rangos de concentración mínima inhibitoria fluctúan para la penicilina desde 0,095 hasta 12-52 µg/mL; para la tetraciclina desde 0,156 hasta 3,13 µg/mL; para el cloranfenicol desde 0,08 hasta 12,52 µg/mL, para la rifampicina desde 0,08 µg/mL y hasta 1,56 µg/mL y para la ciprofloxacina desde 0,15 hasta 2,4 µg/mL. Los antibióticos que presentan los valores más bajos son la ciprofloxacina, la rifampicina y la tetraciclina, y el valor más elevado que se obtuvo se presenta ante el cloranfenicol y la penicilina.⁵⁰

SEROGRUPOS Y SEROVARES DE LEPTOSPIRAS CUBANAS

Durante todos estos años, el LNRE-B ha abordado numerosos estudios para la clasificación serológica de aislados cubanos de leptospiras. Entre estos trabajos se encuentran el que se realiza en 1996, para agrupar serológicamente 20 cepas de leptospiras aisladas en la provincia Holguín, dentro de los serogrupos Ballum, Canicola y Pomona.⁵¹

Un reporte de 2002 muestra el estudio de 204 cepas de leptospiras, obtenidas a partir de hemocultivos de pacientes con leptospirosis humana, procedentes de diferentes regiones del país. Mediante las pruebas de determinación de especie se halló que todas pertenecían al complejo patogénico *Leptospira interrogans*, y al caracterizarlas hasta serogrupo usando 13 sueros hiperinmunes se detectan Ballum, Pomona y Canicola como predominantes. Por primera vez se encontraron los serogrupos Pyrogenes, Autumnalis y Betaviae, no aislados con anterioridad en pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Estos resultados relacionan a los ratones, cerdos y perros como principales reservorios de esta entidad y contribuyen al perfeccionamiento de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana.⁵² En este mismo año, se estudian 18 cepas de *Leptospira*, aisladas de pacientes con leptospirosis humana de 3 provincias de Cuba, empleando métodos serológicos y genéticos. Las cepas son agrupadas por aglutinación microscópica (MAT), con 8 antisueros policlonales y 9 anticuerpos monoclonales (AcMs). Alternativamente se les realizan a las cepas la extracción del ADN, el que se amplifica por una PCR y se digiere con las enzimas de restricción Alu I y Hae III. Todas las cepas autóctonas y de referencia amplificaron su ADN a la talla de 631pb.⁵³

En el 2003, se reporta la existencia de los serogrupos Ballum, Pomona, Canicola e Icterohamorrhagiae en sueros de casos asociados a evento epidémico de leptospirosis ocurrido en Villa Clara. En este estudio, se aíslan dos cepas del serovar Ballum, lo que confirma la etiología de la enfermedad en la población estudiada.¹⁶

Entre el 2006 y 2008 en Cuba, se encuentran en 26 aislados clasificadas con *Leptospira* spp, los serogrupos Pomona (11) para un 42,3 %, Canicola (6) para un 23,1 %, Icterohamorrhagiae (5) para un 19,2 %, Ballum (2) para un 7,7 %, Hebdomadis y Louisiana (1) para un 3,8 %.⁵⁴

En 2007, se reporta el uso de la metodología de los anticuerpos monoclonales para clasificar 16 aislados de leptospiras patógenas. En el estudio, prevalecen los serovares Pomona Pomona, Pomona Mozdok y Canicola Canicola.⁵⁵

Otro estudio de nuestro medio, demuestra que en 293 pacientes asociados a dos eventos epidémicos con sospecha de leptospirosis, ocurridos en provincias orientales en 2005, se encuentran serológicamente los serogrupos Canicola, Ballum, Icterohamorrhagiae y Pomona en orden decreciente, lo que posibilita confirmar la etiología de estos dos eventos epidemiológicos.²⁰

Entre los años 2007-2014 en Cuba se estudian un total de 79 aislamientos siendo 21 de la provincia de Las Tunas y 58 de Holguín, y se encuentran por orden de frecuencia los serovares Ballum Guangdong, Ballum Arborea, Ballum Ballum, Pomona Pomona, Pomona Mozdok, Pomona Proechimis, Canicola Canicola, Icterohamorrhagiae Copenhageni e Icterohamorrhagiae Icterohamorrhagiae. Once aislados no tipados amplificaron su ADN por PCR-Lip32 para leptospirosis patógenas.⁵⁶

La tabla 1 muestra los principales aportes realizados por el LNRE-B en el periodo 1992 y hasta 2016, resultados que enriquecen el conocimiento sobre la circulación del agente causal en Cuba y apoyan al programa nacional de prevención y control de la leptospirosis en nuestro país.

FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Otro de los aportes del LNRE-B, es la capacitación sostenida de los recursos humanos en la temática de leptospirosis. Para llevar esto el IPK, conjuntamente con el MINSAP, la OPS, y prestigiosas instituciones científicas, convocan periódicamente a la realización de cursos-talleres y reuniones científicas internacionales sobre el tema de Leptospirosis, con el objetivo de que los participantes junto a profesores, en las temáticas de epidemiología, clínica, microbiología y control de vectores, debatan en sesiones teóricas-prácticas, conferencias y exposiciones, los aspectos más relevantes y actuales sobre la enfermedad en humanos y animales, dirigidos a fomentar la prevención, la vigilancia y control en nuestros países. La tabla 2 muestra el número de capacitaciones internacionales que organiza y desarrolla el LNRE-B desde el 2001 y hasta el 2016, el número de delegados y los países participantes. En todas las ocasiones hemos contado con importantes expertos y asesores en leptospirosis, procedentes de la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS, siglas en inglés) y la OMS-OPS, quienes han contribuido a los logros alcanzados por los especialistas cubanos.

El prestigio de los investigadores del LNRE-B ha sido demostrado también a través de las capacitaciones realizadas en países de la región de Centroamérica y el Caribe, incluidas en los proyectos de cooperación técnica entre países (TCC) auspiciados por la OPS. Los principales TCC realizados satisfactoriamente son: "Intervención para el fortalecimiento de la vigilancia clínica, epidemiológica y microbiológica, de la leptospirosis y el dengue en Honduras, Guatemala, y Cuba" (noviembre 2006-noviembre 2007), "Leptospirosis humana y su relación con el ecosistema en Cuba" entre Guatemala, Honduras, República Dominicana y Cuba, "Prevención y control de enfermedades zoonóticas desatendidas, con énfasis en leptospirosis y brucelosis" llevado a cabo por Honduras, Guatemala, Cuba, República Dominicana, y Panamá durante el bienio 2012-2013.

Tabla 2. Capacitaciones de recursos humanos realizadas en el LNRE-B-IPK, en el periodo 2001-2016

Capacitación	Delegados		Países
	Extranjeros	Cubanos	
"Leptospirosis 2001" (7 al 18 de mayo) ⁵⁷	37	66	Holanda, Ecuador, Alemania, USA, México, Chile, Colombia, Brasil, Panamá, Perú, Francia, Venezuela y Cuba
2 ^{do} Taller y Reunión Científica Internacional "Leptospirosis Habana 2004" (17 al 28 de mayo)	29	56	India, Brasil, Colombia, Italia, Dinamarca, Nicaragua, México, Holanda y Cuba
3 ^{er} Taller y Reunión Científica Internacional "Leptospirosis Habana 2006" (8 al 16 de mayo) ⁵⁸	39	73	Canadá, Holanda, Italia, Australia, Brasil, República Dominicana, Colombia, Ecuador, Guatemala, Venezuela, Costa Rica y Cuba
4 ^{ta} Reunión Científica y Taller Internacional "Leptospirosis Habana 2008" (12 al 23 de mayo)	34	84	Holanda, Australia, Brasil, Argentina, Colombia, Guatemala, República Dominicana, Francia, México, Nicaragua y Cuba
I Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis "Espiroquetas Habana 2010" y V Taller Internacional "Leptospirosis Habana 2010" (5 al 14 de mayo)	32	84	Argentina, Australia, Brasil, Colombia, Corea, Croacia, España, Francia, Holanda, Honduras, Irán, México, Perú, Portugal, Suiza y Cuba
VI Taller Internacional "Leptospirosis Habana 2012", I Curso Pre Congreso de "Borreliosis de Lyme: del vector a la enfermedad" y el II Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis "Espiroquetas Habana 2012" (15 al 25 de abril) ⁵⁹	39	111	Colombia, Corea, Guatemala, México, Italia, USA, Dinamarca, México, Holanda, Suiza y Cuba
I Taller Internacional "Espiroquetas Habana 2014" y el III Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis "Espiroquetas Habana 2014" (19 al 28 de mayo)	20	61	Guatemala, Colombia, México, Panamá, Suiza, Holanda, Rusia y Cuba
IV Curso-Taller Internacional "Espiroquetas Habana 2016" (9 al 13 de mayo) ⁶⁰	20	66	USA, Suiza, Angola, Colombia, Costa Rica, México, Perú y Cuba

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a cada uno de los autores que contribuyeron con su trabajo a la realización de este artículo.

Conflicto de intereses

El autor no declara conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hartskeerl RA. Leptospirosis: a prototype neglected infectious disease [disertación]. Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso/Cubano de Microbiología y Parasitología y IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. La Habana: Palacio de Convenciones; 2009.
2. Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease. J Med Microbiol. 1999a; 48: 417-8.
3. Levett PN. Leptospirosis [disertación]. Second International Leptospirosis Society Meeting (ILS). Australia. 1999b.
4. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 736-47.

5. Hartskeerl RA, Smits H, Goris MGA, Terpstra WJ. Manual of International course on laboratory methods for the diagnosis "Leptospirosis Habana 2008". 4^{ta} ed. La Habana: PALCOGRAF - Palacio de Convenciones; 2008. p. 1-109.
6. Cruz de la Paz R, Rodríguez P, López C, Atienzar E, Abreus J, Aldama F. Reactogenicidad de la vacuna antileptospirósica en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol. 1986;24(1):407-12.
7. Cruz de la Paz R. Estrategia cubana para el control y prevención de la leptospirosis en Cuba. Rev Latinoamericana Microbiol. 2002;44(Suppl):22.
8. Padilla Pérez O, Toledo H, Vidal I, Rodríguez I. Comportamiento de la mortalidad por leptospirosis en Cuba, 1987-1993. Rev Cubana Med Trop. 1998;50(1):61-9.
9. Obregón Fuentes AM, Martínez G, Martínez R, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J, et al. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios cubanos vacunados con vax SPIRAL[®]. Rev Cubana Med Trop. 2004;56(2):148-51.
10. González González M, Martínez R, Cruz R, Infante JF, González I, Baró M, et al. vax-SPIRAL[®]. Vacuna antileptospirósica trivalente para uso humano; investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. Biotecnología Aplicada. 2004;21(2).
11. Martínez Sánchez R, Pérez A, Baró M, Alvarez M, Menéndez J, Díaz M, et al. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis among groups at risk. Rev Panam Salud Pública. 2000;8(6).
12. Martínez Sánchez R, Pérez A, Obregón AM, Rodríguez I, Baly A, Baró M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna cubana inactivada trivalente contra la leptospirosis humana según diferentes esquemas. Rev Cubana Med Trop. 2002;54(1):37-43.
13. Martínez Sánchez R, Pérez A, Quiñones M, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. Rev Panam Salud Pública. 2004;15(4).
14. Obregón Fuentes AM, Otero A, Laferté J. ELISA for detection of human leptospirosis. Mem. del Inst. FIO CRUZ, 1994. Short Communication 365.
15. Rodríguez González I, Martínez R, Zamora Y, Rodríguez J, Fernández C, Obregón AM. Respuesta de anticuerpos IgG antileptospira en individuos inmunizados con vax-SPIRAL. Rev Cubana Med Trop. 2005;57(1):32-7.
16. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández N, Enrique G. Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara. Rev Cubana Med Trop. 2003;55(2):96-9.
17. Verdasquera Corcho D. Leptospirosis humana: un abordaje de su epidemiología en Cuba. [Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biomédicas]. La Habana: IPK; 2010.

18. Hurtado Mola I. Caracterización clínica epidemiológica y de laboratorio en pacientes con sospecha de Leptospirosis ingresados en el IPK (enero-junio de 2002). [Tesis para optar por el grado académico de Master en Bacteriología Micología]. La Habana: IP; 2003.
19. Verdasquera Corcho D, Rodríguez I, Obregón AM, Fernández C, Segura R, Bustabad E, et al. Leptospirosis humana en la provincia Guantánamo: reflexiones de una epidemia. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1).
20. Rodríguez González I, Fernández C, Obregón AM, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, et al. Confirmación microbiológica de 2 brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1):19-23.
21. Verdasquera Corcho D, Pérez Soler K, Norales Mejías AD, Vázquez Pérez A. Estratificación del riesgo de enfermar y morir por leptospirosis humana. Rev Cubana de Med Trop. 2013;65(2):191-201.
22. Verdasquera Corcho D, Galí A, Sanchez L, Alpizar D, Vega B, Calas V. Variación de la morbilidad y mortalidad por leptospirosis humana. Cuba, 1998-2007. Rev Panam Infectiol. 2010;12(4):22-30.
23. Díaz M. Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) Seleccionadas. BolIPK semanal (La Habana, Cuba). 2016;6(52):409.
24. Barrios Fajardo MM. Hemaglutinación. Su aplicación al diagnóstico de la Leptospirosis humana en el municipio Santiago de Cuba. [Tesis para optar por el título de médico especialista de primer grado en Microbiología]. La Habana: INHEM; 1986.
25. De Valle Fernández Y. Aislamiento y determinación de leptospiras en aguas. [Tesis para optar por el título de médico especialista de primer grado en Microbiología]. La Habana: INHEM; 1986.
26. Morales Casas G. Empleo de una técnica de aglutinación en lámina en el serodiagnóstico de la leptospirosis humana. [Tesis para optar por el título de Licenciado en Microbiología]. La Habana: UH; 1990.
27. Obregón Fuentes AM, Herrera C, López C. Evaluación de la CIE en el diagnóstico serológico de la Leptospirosis humana. Rev Cubana Med. Trop. 1994;45(1):67-70.
28. Gil Fernández MC. Empleo de antígenos de *L. interrogans* para el diagnóstico serológico de la leptospirosis por IFI. [Tesis para optar por el título de médico especialista de primer grado en Microbiología]. La Habana: IPK; 1991.
29. Obregón Fuentes AM, Martell M. Diagnóstico serológico de la Leptospirosis humana empleando 3 variantes de la HAT. Rev. Cubana Med. Trop. 1999;51(1):60-2.
30. Mora Llanos MM. Empleo de tres variantes de IFI para el diagnóstico de la leptospirosis humana. [Tesis para optar por el título de médico especialista de primer grado en Microbiología]. La Habana: IPK; 1993.

31. Tomas Abreu M. Diagnóstico sero-epidemiológico y clínico de la leptospirosis humana. [Tesis para optar por el título de médico especialista de primer grado en Microbiología]. La Habana: IPK; 1994.
32. Obregón Fuentes AM, Laferté J, Otero A. Aplicación del sistema ELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales a leptospiras en diferentes grupos de estudio. Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 1995;14(2):6-10.
33. Rodríguez González I. ELISA cuantitativo, útil para el diagnóstico de la leptospirosis humana y en la evaluación de una vacuna contra leptospiras. [Tesis para optar por el título de Licenciado en Microbiología]. La Habana: U; 1996.
34. Yndart Arias A. Puesta a punto y evaluación de un sistema UMELISA para la detección de niveles de anticuerpos IgG asociados a la leptospirosis. [Tesis para optar por el título de Licenciado en Microbiología]. La Habana: UH; 1999.
35. Pérez Orphee M. Estudio de una variante de MAT para el diagnóstico de la leptospirosis humana. [Tesis para optar por el Grado Académico de Máster en Bacteriología-Micología]. La Habana: IPK; 2000.
36. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Rodríguez I, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. Pan American J of Public Health. 2004;16(4):259-65.
37. Rodríguez González I, Fernández C, Llerena C, Victoria B, Rodríguez J, Obregón AM. Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop. 2002;54(1):44-7.
38. Martínez Salueiro B, Obregón AM. Lepto Tek Lateral Flow: un método para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2005;43(1).
39. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Zamora Y. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1).
40. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Martínez I, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J, et al. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2011;63(3).
41. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez Y, Echevarría E, Rodríguez J, et al. Detección de anticuerpos IgM contra leptospiras por un sistema comercial ELISA-IgM. Rev Cubana Med Trop. 2013;65(2):202-10.
42. Pérez Elías Y, Obregón AM, Lemos G, Machado H, Rodríguez IC, Rodríguez J. Evaluación de un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral para la pesquisa de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Tropical. 2015;67(2).
43. Zamora Martínez Y, Fernández C, Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Rodríguez N. Método de la PCR en la detección temprana de Leptospira spp en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1).

44. Rodríguez Olivera Y, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez J, Valdés Y, Echevarría E. et al. Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011. Rev Cubana de Med Trop. 2013;65(2):211-22.
45. Noda Ramos AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govin A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR methods for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. Rev Inst Med Trop, Sao Paulo. 2014;56(5):411-5.
46. Noda Ramos AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govin A, Obregón AM. Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos. Rev Cubana Med Trop. 2014;66(3):447-52.
47. Noda Ramos AA, Rodríguez I. DNA isolation by Chelex-100: an efficient approach to consider in leptospirosis early stages. J Coastal Life Med. 2014;2(6):501-4.
48. Beltrán Lissabet JF. Extracción de proteínas de membrana externa de leptospiras con la utilización del Tritón X-100. [Tesis para optar por la licenciatura en Microbiología]. La Habana: Facultad de Biología, UH; 2012.
49. Tamayo Brito C. Establecimiento de técnicas de zimografía para el análisis de proteasas y nucleasas en *Leptospira* spp. [Tesis para optar por la Licenciatura en Microbiología]. La Habana: UH; 2015.
50. Obregón Fuentes AM, Llanes R, Fernández C, Hernández I, Rodríguez J. Desarrollo de un método para determinar la concentración mínima inhibitoria en cepas de referencias de leptospiras. Rev Cubana Med Trop. 2005;7(1):11-6.
51. Saltarén Cobas A. Agrupación de cepas de leptospiras por el método de aglutinación microscópica con sueros hiperinmunes. IPK-CPHEM Holguín. [Tesis para optar por el grado académico de Máster en Bacteriología-Micología]. La Habana: IPK; 1996.
52. Rodríguez González I, Obregón AM, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2002;40(1):11-5.
53. Victoria Martínez B, Fernández C, Rodríguez J, Obregón AM, Rodríguez I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. Rev Cubana Med Trop. 2002;54(1):48-51.
54. Zamora Martínez Y. Caracterización de cepas de leptospiras circulantes en Cuba en el periodo 2006-2008 [disertación]. Congreso Internacional 70 Aniversario IPK. Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. La Habana: Palacio de Convenciones; 2009.
55. Obregón Fuentes AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1):68-70.
56. Rodríguez González Y. Caracterización de cepas de leptospiras circulantes en Cuba en el periodo 2008-2014 [disertación]. Congreso Internacional "Espiroquetas Habana 2016". Hotel Meliá Habana. La Habana. 2016.

57. Fernández Molina C, Obregón AM. Reunión Científica Internacional "Leptospirosis 2001". Rev Cubana Med Trop. 2002;54(1):5-6.
58. Fernández Molina C, Obregón AM. Tercer Taller y Tercera Reunión Científica Internacional "Leptospirosis Habana 2006". Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1):5-7.
59. Fernández Molina C, Obregón AM. VI Taller Internacional "Leptospirosis Habana 2012". I Curso Pre-Congreso de "Borreliosis de Lyme: del vector a la enfermedad". II Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis "Espiroquetas Habana 2012". Rev Cubana Med Trop. 2013;65(2):146-8.
60. Obregón Fuentes AM, Rodríguez Y. IV Curso-Taller Internacional "Espiroquetas Habana 2016". Rev Cubana Med Trop. 2017;69(1).

Recibido: 6 de septiembre de 2017.

Aceptado: 13 de octubre de 2017.

Ana Margarita Obregón Fuentes. Departamento de Bacteriología-Micología, CIRD, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía km 6½. La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu