

1-1-2016

Estudio exploratorio de Leptospira spp. en porcinos, roedores y agua en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta

María Catalina Ospina Pinto
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

Ospina Pinto, M. C. (2016). Estudio exploratorio de Leptospira spp. en porcinos, roedores y agua en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/58

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO EXPLORATORIO DE *Leptospira* spp. EN PORCINOS, ROEDORES Y
AGUA EN EL CICLO PRODUCTIVO DE UNA GRANJA EN PUERTO LÓPEZ, META

Trabajo de Grado

MARÍA CATALINA OSPINA PINTO

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá, Colombia

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO EXPLORATORIO DE *Leptospira* spp. EN PORCINOS, ROEDORES Y
AGUA EN EL CICLO PRODUCTIVO DE UNA GRANJA EN PUERTO LÓPEZ, META

Trabajo de Grado

MARÍA CATALINA OSPINA PINTO

76141209

Directora

PATRICIA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Bióloga, Esp., M.Sc.

Bogotá, Colombia

2016

APROBACIÓN

DIRECTORA

PATRICIA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

JURADO

DIEGO SOLER-TOVAR

JURADO

CÉSAR AUGUSTO DÍAZ ROJAS

JURADO

MARTHA FABIOLA RODRÍGUEZ

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector	Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo
Vicerrector Académico	Hno. Carlos Carvajal Costa
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Dr. Luis Fernando Ramírez
Vicerrector De Promoción Y Desarrollo Humano	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
Vicerrector Administrativo	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Dr. Claudia Aixa Mutis
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón
Director De Posgrados	Dr. Ernesto Dalmau Barros

COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, al Divino Niño Jesús y a mi familia, porque sin ellos no habría sido posible culminar este trabajo y esta etapa de mi vida personal y profesional.

A mi directora, Patricia Hernández-Rodríguez por su confianza y formación durante todo este proceso.

A mis jurados, Dr. Diego Soler-Tovar, Dr. César Augusto Díaz Rojas y Dra. Martha Fabiola Rodríguez, cuyas sugerencias enriquecieron de gran forma mi trabajo, sus enseñanzas y apoyo durante este proyecto.

A Pedro Navas, quién me acompañó, fue mi fuerza y la voz de ánimo para cumplir esta etapa.

A mis amigos, colegas y estudiantes de Medicina Veterinaria, por las palabras de apoyo y la colaboración tanto en la toma de muestras como en el procesamiento de éstas en el laboratorio.

Al propietario Álvaro Eslava y al recurso humano de la granja porcina donde se realizó el estudio, por permitirme llevar a cabo todos los procedimientos necesarios y su gran colaboración.

RESUMEN

Leptospirosis es una zoonosis con múltiples huéspedes y reservorios de *Leptospira*, su agente etiológico, que se debe abordar desde el concepto de “Una Salud”. Son pocos los estudios que involucran todas las etapas del ciclo productivo porcino y que emplean diferentes metodologías para el estudio de *Leptospira* en los porcinos y en fuentes de agua. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio exploratorio de *Leptospira* spp. mediante métodos diagnósticos convencionales y moleculares en porcinos, roedores sinantrópicos y agua en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta, Colombia. Se tomaron muestras de sangre a los porcinos (n=65) para realizar la prueba de aglutinación microscópica (MAT), también muestras de orina y agua (n=80) con las cuales se realizó el aislamiento a través de cultivo, la clasificación a nivel de serogrupo por MAT, y se detectó *Leptospira* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las trampas para la captura de roedores fueron ubicadas en la granja. La prevalencia encontrada en porcinos fue del 89.2% (58/65), siendo Grippotyphosa el serogrupo de mayor presentación. La frecuencia de *Leptospira* spp. a través del cultivo fue del 25% (20/80). Se identificaron las cepas aisladas de porcinos y agua mediante PCR encontrando que el 100% (20/20) de los cultivos positivos correspondía al género *Leptospira* por el gen *rrl*, y el 50% (10/20) correspondía a especies patógenas por el gen *lipL32*. No se logró capturar ningún roedor. Se concluyó que como la bacteria está presente en los porcinos y fuentes de agua de todas las etapas del ciclo, posiblemente existe transmisión de *Leptospira* spp. en la interfaz animal-ambiente.

Palabras clave: Industria porcina, zoonosis, Una Salud, interfaz animal-ambiente.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis that has multiple hosts and reservoirs of *Leptospira*, the causative agent, which must be addressed from the concept of “One Health”. There are few studies that involve all the stages of the pig production cycle and that also use different methodologies for the study of *Leptospira* in pigs and water sources. The aim of this work was to perform an exploratory study of *Leptospira* spp. by conventional and molecular diagnostic methods in pigs, synanthropic rodents and water in the pig production cycle on a farm in Puerto López, Meta, Colombia. Blood samples were taken from pigs (n=65) for microscopic agglutination test (MAT), also urine and water samples (n=80) with which the isolation through culture was made, the classification at serogroup level by MAT, and *Leptospira* was detected by polymerase chain reaction (PCR). The traps to catch rodents were placed on the farm. The prevalence found in pigs was 89.2% (58/65), Grippityphosa was the serogroup with the highest presentation. The frequency of *Leptospira* spp. through culture was 25% (20/80). Strains isolated from pigs and water were identified by PCR finding that 100% (20/20) of the positive cultures belonged to the genus *Leptospira* by the *rrl* gene, and the 50% (10/20) corresponded to pathogenic species by the *lipL32* gene. It was not possible to capture any rodent. It was concluded that as the bacteria is present in pigs and water sources of all the stages of the cycle, there is possibly transmission of *Leptospira* spp. in the animal-environment interface.

Key words: Pig industry, zoonoses, One Health, animal-environment interface.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema y justificación	1
1.2. Objetivo general y específicos	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Leptospirosis: generalidades y agente etiológico	5
2.2 Epidemiología e impacto en Salud Pública	6
2.3 <i>Leptospira</i> spp. en la interfaz animal-ambiente	8
2.4 Una Salud	10
2.5 Leptospirosis en el mundo y en Colombia	11
2.6 Transmisión, patogénesis y patología	12
2.7 <i>Leptospira</i> spp. en porcinos, roedores y agua	13
2.8 Métodos diagnósticos convencionales y moleculares	16
3. METODOLOGÍA	19
3.1 Localización	19
3.2 Población y muestra	20
3.3 Métodos y procedimientos	22
3.3.1 Diseño metodológico	22
3.3.2 Toma de muestras en porcinos	23
3.3.3 Captura de roedores	23
3.3.4 Muestras de agua	24

3.3.5 Prueba de MAT	25
3.3.6 Cultivo microbiológico	25
3.3.7 Antisueros	26
3.3.8 Extracción de ADN	26
3.3.9 PCR	27
3.4 Diseño estadístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Condiciones generales de la granja y población	29
4.2 Prueba de Micro Aglutinación	30
4.3 Aislamiento a través de cultivo	31
4.4 Clasificación serológica de los aislamientos	32
4.5 Análisis molecular	33
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	63
7. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	65
8. LISTA DE REFERENCIAS	66
9. ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión en porcinos	21
Tabla 2. Variables respuesta a medir en el estudio	28
Tabla 3. Muestras positivas y negativas a los métodos diagnósticos convencionales y moleculares	35
Tabla 4. Asociación género y etapa del ciclo con las pruebas diagnósticas	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>Leptospira</i> spp.	6
Figura 2. Municipio de Puerto López, Meta	19
Figura 3. Flujograma procedimientos metodológicos generales	23
Figura 4. Ubicación trampas para roedores	24
Figura 5. Trampas para roedores con cebo	24
Figura 6. Revisión cultivos	25
Figura 7. Extracción de ADN de cultivos positivos.	26
Figura 8. PCR de muestras y cultivos positivos	27
Figura 9. Plano de la granja porcina, ubicación trampas de roedores y fuentes de agua	29
Figura 10. Títulos de anticuerpos frente a los diferentes serogrupos de <i>Leptospira</i> incluidos para el MAT realizado en los sueros de porcinos	31
Figura 11. Cultivo de agua positivo a <i>Leptospira</i> spp.	32
Figura 12. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de cultivos positivos de muestras de orina y fuentes de agua para el gen <i>rrl</i> (482 pb).	34
Figura 13. Electroforesis de cultivos positivos para el gen <i>lipL32</i>	35

1. INTRODUCCIÓN

Para comprender la relación entre la infección por *Leptospira* spp. en humanos y en animales, así como el papel que tiene el ambiente en su transmisión, se debe realizar un abordaje integral y holístico como el de “Una Salud”, teniendo en cuenta que el conocimiento de los reservorios o animales portadores es considerado esencial para entender la epidemiología, transmisión y orientar el control de la leptospirosis en diversos escenarios (Allan et al., 2015).

1.1 Planteamiento del problema y justificación

En la interfaz humano-animal-ambiente, la leptospirosis tiene un papel importante con múltiples huéspedes y reservorios de *Leptospira*, su agente etiológico y relacionada con factores como el manejo, el comportamiento animal y el clima que favorecen la ocurrencia de esta zoonosis que tiene mayor presentación en países tropicales y subtropicales (Jobbins, Sanderson y Alexander, 2013; Petrakovsky et al., 2014).

La infección por *Leptospira* spp. ocasiona pérdidas económicas en el ciclo productivo porcino, especialmente en hembras reproductoras por la alteración de los parámetros reproductivos manifestándose con abortos, reabsorciones embrionarias, lechones nacidos débiles, reducción en el tamaño de las camadas, y lechones nacidos muertos; no obstante, los efectos de la enfermedad también se pueden presentar en las otras etapas, ya sea con diarrea, ictericia y hemoglobinuria en lechones lactantes, por machos reproductores que infectan a

las hembras o por animales de otras etapas como pre cebo y engorde con infección subclínica pero que están eliminando el microorganismo al ambiente (Ellis, 2012; Feraud et al., 2005).

En Colombia, se han reportado seroprevalencias hasta del 86.6% en porcinos y hasta del 82.7% en roedores; se han realizado pocos estudios en muestras ambientales, siendo las fuentes de agua un vehículo importante de transmisión tanto para humanos como para animales, e igualmente se debe considerar que esta enfermedad es emergente asociada con inundaciones y con temporadas de lluvia (Arrieta, Rodríguez y Calderón, 2010; Giraldo, Orrego y Santacruz, 2002a).

En el departamento del Meta, hasta la fecha de éste estudio, son limitados los reportes de *Leptospira* en porcinos y en roedores, y no se han reportado investigaciones en fuentes de agua. Además, los estudios realizados en la especie porcina no sólo en esta región sino en todo el país e incluso en el ámbito mundial, se limitan a evaluar una o dos etapas del ciclo productivo porcino (Almenteros et al., 2004; Ochoa, Sánchez y Ruiz, 2000). Es importante destacar que en cada etapa se encuentran reservorios que son potenciales fuentes de infección (Giraldo, Orrego y Betancurth, 2002b) siendo necesario realizar estudios que incluyan todas las etapas para disminuir el impacto en salud y producción animal y el riesgo para la población humana debido a que leptospirosis es considerada como una de las zoonosis ocupacionales más importantes (Dechner, 2014).

Desde el año 2007, la leptospirosis se reconoce como un evento de notificación obligatoria en humanos para el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA); sin embargo, no lo es en animales, y existen fallas en la

vigilancia debido a la falta de disponibilidad de técnicas diagnósticas y a la similitud de las manifestaciones clínicas con otras enfermedades presentes el país como dengue e influenza, entre otras (Bello et al., 2013; Cristancho-Torres, Benítez-Cabrera y Góngora-Orjuela, 2012).

Para el diagnóstico de leptospirosis, la prueba de microaglutinación (MAT) es la “*gold standard*”, sin embargo, es dispendiosa, necesita una colección de cepas para ser utilizadas como antígenos, la interpretación de los resultados es complicada por las frecuentes reacciones cruzadas entre los serogrupos y por la determinación del punto de corte dependiendo de la endemidad de la región, y entre otras debilidades su sensibilidad varía entre 40 y 89.2%, y su especificidad entre 85.97 y 100%, la cual depende del panel de serovares utilizados y de si en este se tienen cepas locales (Hernández-Rodríguez et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2011; Moreno y Agudelo-Flórez, 2010; Perez y Goarant, 2010; Salaun et al., 2006).

El uso de diferentes métodos moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un aumento en la última década, y es importante para proporcionar un diagnóstico definitivo y temprano de la enfermedad, así como para conocer los aislamientos locales; además, se ha reportado 100% de sensibilidad y 99% de especificidad mediante PCR en muestras de orina en comparación con el cultivo microbiológico que es considerado como el método diagnóstico más confiable; por lo tanto, es recomendable complementar los resultados serológicos con el aislamiento a través de cultivo y pruebas moleculares, para establecer la posible circulación de la bacteria en poblaciones específicas como es el caso del

ciclo productivo porcino, y en potenciales fuentes de infección como los roedores y las fuentes de agua (Hernández-Rodríguez et al., 2011; OIE, 2014).

1.2 Objetivo general y específicos

General

- Realizar un estudio exploratorio de *Leptospira* spp. mediante métodos diagnósticos convencionales y moleculares en porcinos, roedores sinantrópicos y agua en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta, Colombia.

Específicos

- Establecer los serogrupos de *Leptospira* spp. en los porcinos y roedores sinantrópicos de la granja por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
- Demostrar la frecuencia de *Leptospira* spp. a partir del aislamiento a través del cultivo de muestras de orina de porcinos, riñón de roedores sinantrópicos y agua.
- Identificar cepas patógenas y saprófitas aisladas de porcinos, roedores sinantrópicos y agua, mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Leptospirosis: generalidades y agente etiológico

Leptospirosis es una enfermedad zoonótica endémica de potencial epidémico, que afecta al hombre y a los animales, tanto domésticos como silvestres, que a su vez son fuente de infección para los humanos. Tiene impacto económico y en la salud en muchas regiones del mundo, pero a pesar del aumento en el número de casos y focos se mantiene como una enfermedad desatendida, por lo que se ha convertido en una amenaza para la salud pública (Schneider et al., 2013).

El agente etiológico es una espiroqueta aerobia obligada del género *Leptospira*, orden Spirochaetales y de la familia *Leptospiraceae*, que tiene una alta movilidad por el endoflagelo que posee, una longitud de 6 a 20 μm , un diámetro de 0,15 a 0,3 μm , y es de forma helicoidal y delgada como se observa en la figura 1. *Leptospira* presenta una estructura típica de doble membrana, que relaciona a la pared celular de peptidoglicano con la membrana citoplasmática, y se encuentra rodeada por una membrana externa, conformada por proteínas integrales de membrana, por proteínas funcionales y estructurales, la mayoría lipoproteínas, y por el lipopolisacárido (LPS), que es el principal antígeno (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

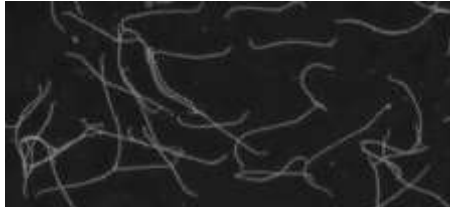


Figura 1. Micrografía electrónica de *Leptospira* spp. Fuente: Picardeau (2013).

De acuerdo con Picardeau (2013), existen 20 especies de *Leptospira* que según su patogenicidad se clasifican en tres grupos: 9 patógenas, 6 saprófitas y 5 intermedias, siendo *L. interrogans* la especie patógena más importante y la saprófita *L. biflexa*. Entre las especies de *Leptospira* se han descrito 20 serogrupos, en los que se encuentran agrupados según su composición antigénica más de 300 serovares de los que el principal determinante es la estructura del LPS, y que al mismo tiempo se dividen en cepas o genotipos.

Dentro de una misma especie, pueden encontrarse serovares patógenos y saprófitos, y dentro de estos heterogeneidad genética entre las múltiples cepas, además ni el serogrupo ni el serovar pueden predecir la especie de *Leptospira*, y aunque los serogrupos no tienen una posición taxonómica son muy útiles desde el punto de vista epidemiológico, por esto es importante realizar los dos tipos de clasificaciones, molecular y serológica (Levett, 2001).

2.2 Epidemiología e impacto en Salud Pública

La incidencia de leptospirosis es más alta en países de clima cálido, sin embargo esta es considerada como la zoonosis de mayor distribución mundial con excepción de las zonas polares, por las condiciones ambientales que permiten la supervivencia de la bacteria durante tiempos prolongados gracias a las altas

temperaturas, humedad, tipo de suelo y pH del mismo. El tipo de hospedero tiene un papel fundamental debido a que existen unos de mantenimiento y otros incidentales; los primeros son especies animales en las que la infección con determinado serovar de la bacteria es endémica y no presentan manifestaciones graves de la enfermedad, mientras que los incidentales, son especies que no están adaptadas a *Leptospira* y por lo tanto es probable que presenten enfermedad severa o fatal, aunque algunas especies animales pueden mantener unos serovares y ser incidentales de otros (Levett, 2004).

Generalmente, los serovares de *Leptospira* se asocian con determinadas especies, por ejemplo los porcinos con Pomona y Bratislava, los bovinos con Hardjo, los caninos con Canicola y la fauna silvestre con Grippotyphosa y Tarassovi; a pesar de esto, cualquier especie no solo se podrá infectar con los serovares que mantiene sino también con serovares mantenidos por otras especies, resaltando la importancia de conocer los serovares y huéspedes de mantenimiento en cada región para entender la epidemiología y realizar un control adecuado (Levett, 2004).

El periodo de incubación de *Leptospira* es en promedio de 10 días, y la bacteria comienza a eliminarse por la orina aproximadamente 3 semanas después de la aparición de los síntomas; por lo tanto, el periodo de transmisibilidad depende de la duración de esta leptospiruria, que es prácticamente de por vida en el caso de los roedores que son el principal reservorio de *Leptospira*, y en el caso de otros animales puede ser de más o menos 1 mes, aunque puede durar hasta 11 meses (INS, 2011).

Esta enfermedad se considera tanto rural como urbana, afecta principalmente a poblaciones vulnerables que no tienen acceso a agua potable, malas condiciones sanitarias y presentan infestación por roedores, asociada con la pobreza en países de bajos y medianos ingresos, mientras que en países de altos ingresos se asocia con actividades recreacionales donde se tiene contacto con agua o suelos húmedos. El impacto de la leptospirosis en humanos es devastador debido a que puede haber pérdida de tiempo de trabajo, se puede requerir hospitalización e incapacidad de individuos en edad productiva, e igualmente es una carga para los sistemas de salud de los países (Schneider et al., 2013).

Por otro lado, Guerra (2013) reporta que en humanos la leptospirosis es reconocida como una enfermedad ocupacional, que afecta a determinados grupos en riesgo como trabajadores de arrozales y otros productos agrícolas, de ambientes infectados como los que realizan mantenimiento de alcantarillas y soldados, pero principalmente a personas que trabajan con animales, ya sean operarios de granjas, mataderos, procesadores de productos y veterinarios, donde el contacto entre humanos y animales, que son reservorios potenciales, y su hábitat incrementa el riesgo de adquirir la enfermedad.

2.3 *Leptospira* spp. en la interfaz humano-animal-ambiente

En un estudio realizado en animales domésticos y silvestres para estimar la prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* se encontró un 43% de seropositividad en bovinos, 72% en venados, 80% en caballos, 43% en perros y 100% en gatos, mostrando la amplia dispersión y alta prevalencia en diferentes serogrupos de *Leptospira*, resaltando que es endémica en animales domésticos y

que afecta a todas las especies, siendo un riesgo para los humanos que generalmente se infectan a través del agua contaminada con orina de estos reservorios animales, y particularmente en este estudio se identificó el serovar Pyrogenes que es raro encontrarlo en animales domésticos pero es uno de los más comunes encontrados en humanos durante el mismo periodo de tiempo del estudio en Nueva Caledonia (Roqueplo et al., 2013).

Arrieta et al. (2010) realizaron un muestreo serológico de *Leptospira* en porcinos, caninos y humanos en granjas porcícolas en Colombia, donde encontraron prevalencias del 86.6%, 36.7% y 77.4% respectivamente, y obtuvieron 3 aislamientos de orina de porcinos, 2 de orina de caninos y 2 de muestras de agua, en los cuales se confirmó la presencia de ADN de especies de *Leptospira* patógenas mediante PCR, indicando la posible transmisión entre estas especies y las fuentes de agua.

Así mismo, Ochoa et al. (2000) en sistemas de producción “cerdos-pastos-leche” obtuvieron prevalencias del 22.4% en operarios, del 60.9% en bovinos, del 25.7% en porcinos de cría y del 10.3% en porcinos de ceba, afirmando que este tipo de sistema favorece el ciclo endémico de transmisión de *Leptospira*, ya que los 6 serovares estudiados se encontraron en bovinos, porcinos y operarios, lo cual sugiere que la bacteria se puede estar transmitiendo por contacto entre estas especies o por medio de los pastos y aguas contaminadas, resaltando la importancia de los bovinos y porcinos en la circulación de los serogrupos que mantienen y el riesgo que representan para los trabajadores de las granjas.

De igual forma, al evaluar las tasas de infección en animales y humanos y verificar su relación, Langoni et al. (2008) encontraron seroprevalencias de

32.85% en bovinos, de 23.53% en humanos, de 0% en roedores mediante MAT; adicionalmente, no se encontró ningún positivo por cultivo de orina de bovinos y de riñón de roedores, ni por PCR de estas muestras, lo que los llevó a pensar que en el área estudiada los roedores tienen poca o ninguna importancia en la cadena epidemiológica de *Leptospira* spp., mientras que existía la presencia de otras especies como caninos y porcinos en estas fincas, los cuales tenían acceso a las fuentes de agua facilitando su contaminación; además, el agua usada para lavar las porquerizas conducía al depósito y se utilizaba para los otros animales, permitiendo la transmisión entre especies.

2.4 Una Salud

La aplicación o abordaje desde el concepto de Una Salud para el caso de leptospirosis es importante para entender la enfermedad y orientar las medidas de control; teniendo en cuenta que este concepto se aplica especialmente a zoonosis que están siendo desatendidas y que se presentan en países en desarrollo, la mayoría relacionadas con los recursos naturales, siendo las fuentes de agua las más cruciales, debido a que humanos y animales dependen del agua segura para su salud y supervivencia, y mientras el agua se hace más escasa, animales y humanos se ven obligados a compartir áreas y tener contacto facilitando la transmisión de enfermedades y la contaminación de los alimentos; bajo este enfoque es primordial realizar intervenciones de políticas integradas que se dirijan a múltiples causas de salud y que sean transdisciplinarias e intersectoriales, y que involucren a diversos profesionales de las ciencias agropecuarias, antropólogos, economistas, educadores, ingenieros, epidemiólogos, microbiólogos, etc., que

trabajen en conjunto promoviendo y mejorando la salud humana y animal (Mazet et al., 2009).

2.5 Leptospirosis en el mundo y en Colombia

Según la base de datos del HealthMap entre los años 2007 y 2013 hubo 787 alertas globales de leptospirosis, el 63% de estas fueron en el continente americano, el 15% en el Pacífico Occidental, el 14% en el Sur-este de Asia, seguido por Europa con el 8%, y finalmente el 1% y 0.5%, en África y en el Mediterráneo Oriental, respectivamente (Schneider et al., 2013).

En Colombia, los casos de leptospirosis han tenido un aumento importante en algunos años, lo cual se atribuye a las condiciones climáticas como las olas invernales y a la mejora en los sistemas de registro, entre otros factores. Las regiones del país donde se ha encontrado una incidencia más alta es porque llevan a cabo una notificación más constante y por la disponibilidad de pruebas diagnósticas apropiadas; esto evidencia que en Colombia la enfermedad no ha sido bien documentada y la relevancia de esta problemática se opaca por el subregistro de casos (Bello et al., 2013).

Dechner (2014), señala en su estudio retrospectivo sobre la investigación de leptospirosis en Colombia, que la prevalencia real del país sigue siendo desconocida debido a que más del 80% de los estudios de leptospirosis se han basado en MAT, por lo que se debe tener en cuenta las dificultades que tiene esta prueba en su interpretación, siendo necesario seguir investigando en métodos que

determinen la prevalencia con exactitud como las pruebas moleculares que han revelado resultados importantes en varias partes del mundo.

2.6 Transmisión, patogénesis y patología

La transmisión puede ser directa o indirecta; la primera, principalmente por contacto con orina, y otros fluidos corporales como descargas uterinas, semen, leche, fluidos fetales y placentarios, y por vía transplacentaria. La segunda por contacto indirecto con el suelo, agua, y alimentos contaminados, permitiendo la entrada de la bacteria por mucosas, piel húmeda intacta o con lesiones, ingestión o inhalación de gotas o aerosoles de fluidos contaminados con orina de animales infectados, siendo la transmisión hídrica la más importante por ser el mecanismo más frecuente y que determina las características epidemiológicas de la leptospirosis; incluso se han reportado casos por mordedura de animales, y la transmisión entre humanos se ha documentado pero es muy rara (Verdasquera et al., 2011).

Al ingresar al organismo, la bacteria se disemina vía sanguínea y linfática, se multiplica y distribuye produciendo una leptospiremia en la primera semana, y en este periodo puede aislarse en sangre, en cualquier órgano y en LCR, y también se puede presentar pleocitosis. *Leptospira* se adhiere a la pared de los vasos sanguíneos, altera el endotelio y provoca una vasculitis generalizada que ocasiona extravasación de los constituyentes sanguíneos, afecta principalmente al hígado y a los riñones, y una o dos semanas después penetra en el intersticio y se localiza en los túbulos renales formando microcolonias; en esta etapa aparecen los anticuerpos y se elimina la bacteria de todos los tejidos, con excepción de

globo ocular, riñón y cerebro; la duración e intensidad de la leptospiruria depende de cada individuo y del serovar, pero se caracteriza por ser intermitente (Roca, 2006).

En general en todas las especies las lesiones generadas por *Leptospira* no son patognomónicas, dependen del serovar infectante y se asocian con las producidas por un choque endotóxico; principalmente hay ictericia, necrosis de la piel, de la cavidad nasal y oral, edema subcutáneo, focos hemorrágicos en pulmón, músculo esquelético, hígado, bazo, glándulas suprarrenales, piel, y riñones, que son los más afectados y se encuentran edematosos y con focos fibróticos blanquecinos que sobresalen de la corteza del parénquima renal, también puede haber mastitis y los fetos abortados presentan edema, congestión, hemorragias petequiales en corteza renal y necrosis focal en hígado (Sandow y Ramírez, 2005).

2.7 *Leptospira* spp. en porcinos, roedores y agua

En la especie porcina, la infección más frecuente alrededor del mundo es la subclínica, que únicamente tiene evidencia serológica pero no de signos clínicos o estos son inaparentes debido a que la infección es endémica en las granjas porcinas, y se encuentra en hembras vacías y no lactantes, y en animales en etapa de crecimiento, en donde el animal es expuesto a la bacteria y manifiesta un nivel de anticuerpos contra esta, pero ningún signo de enfermedad, y por lo tanto estos animales aparentemente sanos se convierten en portadores del microorganismo y que lo eliminan al ambiente, propagándolo y siendo fuente de infección para otros animales susceptibles (Jackson y Cockcroft, 2007).

En Colombia, los serovares más prevalentes son Pomona, Icterohaemorrhagiae y Bratislava; y específicamente en el departamento del Meta se han reportado seropositividades del 16% en porcinos sacrificados en el matadero de Villavicencio, y del 90% en porcinos de una explotación con problemas reproductivos en la misma ciudad (Almenteros et al., 2004; Morales et al., 2007).

Dos grupos de porcinos son más propensos a desarrollar la infección clínica, las hembras preñadas y los lechones; la infección aguda coincide con el periodo de leptospiremia y sus signos clínicos son fiebre, anorexia y decaimiento principalmente, pero se puede presentar diarrea, ictericia y hemoglobinuria especialmente en lechones infectados con cepas del serovar Icterohaemorrhagiae; sin embargo, en granjas infectadas de forma endémica ocurre en muy pocos animales e incluso puede pasar desapercibida, y una alta proporción de los animales infectados se recuperan una semana después de la aparición de los síntomas (Ellis, 2012).

En la forma reproductiva o crónica, las hembras reproductoras pueden manifestar agalactia, fiebre y anorexia, pero esta se caracteriza por la presentación de abortos, nacimiento de lechones débiles, mortalidad neonatal, y lechones nacidos muertos, y por lo tanto puede causar grandes pérdidas económicas para los productores; adicionalmente, la poca información disponible indica que incluso con vacunación la leptospirosis es una causa común de aborto, y que las diferencias en la patogenicidad de las cepas contribuyen a tener diferentes prevalencias de abortos en granjas infectadas (Ellis, 2006).

Los roedores son el principal reservorio de *Leptospira*, tienen una relación comensal con el microorganismo, el cual se mantiene viable, se multiplica y elimina durante toda su vida, y pueden transferir la bacteria a sus crías en el periodo neonatal o a través de la placenta. Los roedores de los géneros *Rattus*, *Mus* y *Apodermus* son fuente principal de infección natural de *Leptospira* porque contaminan el ambiente, los alimentos y el agua través de su orina, poniendo en riesgo la salud humana y animal, especialmente en regiones cercanas a cuerpos de agua, y teniendo en cuenta que el mayor grupo de mamíferos tanto en términos de individuos como de número de especies es el orden Rodentia, el control integral de estas especies plaga es fundamental para la prevención de la enfermedad (Céspedes, 2005; Tesic et al., 2003).

La transmisión de *Leptospira* por medio del agua es una de las más importantes y frecuentes, debido a que la contaminación de fuentes hídricas resulta en brotes severos de leptospirosis y en presentación de casos por actividades recreacionales, a pesar de esto, no todos los tipos de agua son favorables para la supervivencia de la bacteria debido a que esta se ve afectada por la salinidad, el pH y la temperatura, que si es baja disminuye la multiplicación del agente pero aumenta su tiempo de supervivencia y por el contrario si es alta favorece la multiplicación pero disminuye el tiempo de supervivencia el cual puede ser hasta de 180 días y mantener su capacidad infectante por 22 días (Sandow y Ramírez, 2005).

Se han realizado aislamientos de *Leptospira* a través de cultivo en medio Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH) a partir de agua de ríos o

arroyos, por lo que estas fuentes de agua dulce son un reservorio importante de la bacteria, siendo crucial su análisis debido a que estas son utilizadas para el consumo por poblaciones humanas y animales. Se ha demostrado que *L. interrogans* tiene una capacidad de supervivencia en agua con concentraciones mínimas de nutrientes, y tiene similitudes considerables en cuanto a la presencia de genes involucrados en esta supervivencia y en mecanismos de transducción de señales con *L. biflexa*, aunque existe una mayor tasa de crecimiento de las especies saprófitas con respecto a las patógenas en agua, lo cual no se puede diferenciar por medio del cultivo resaltando la importancia de realizar pruebas moleculares para diferenciarlas (Gutiérrez, 2013).

2.8 Métodos diagnósticos convencionales y moleculares

En la prueba de aglutinación microscópica (MAT), se enfrentan antígenos vivos que representan los diferentes serogrupos con los sueros, y se evalúa el grado de aglutinación por medio de microscopía de campo oscuro, para lo que se deben mantener paneles de leptospiras vivas incluyendo como mínimo todos los serovares circulantes locales o serovares representativos de todos los serogrupos; si el panel está incompleto se pueden presentar falsos negativos. La confirmación de la prueba se establece a partir de un aumento de cuatro veces o más entre dos muestras de sueros pareados con dos semanas de diferencia, no puede diferenciar entre infección actual, reciente o pasada, e identifica el serogrupo presuntivo. La prueba puede ser positiva desde el día 10 después de la aparición de los síntomas, y es importante tener en cuenta que los resultados se pueden

alterar por los datos cronológicos del muestreo, la aparición de síntomas, la vacunación y las terapias antibióticas (Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013).

El aislamiento de *Leptospira* es muy complejo, debido a que depende de la etapa de la enfermedad en que se encuentre el individuo, el cultivo de sangre se debe realizar lo más pronto posible después de la aparición de los síntomas, el dializado peritoneal y el líquido cefalorraquídeo (LCR) durante la primera semana de enfermedad, y la orina desde la segunda semana. El cultivo no permite determinar si las leptospiras aisladas son saprófitas o patógenas; no es posible establecer la especie, el serogrupo, el serovar o la cepa a la que corresponde; por lo tanto, para realizar esta identificación se pueden utilizar métodos serológicos como la aglutinación absorción (CAAT), anticuerpos monoclonales (mAbs) o la prueba de MAT empleando antisueros de referencia, o técnicas moleculares basadas principalmente en PCR que permiten la identificación de *Leptospira*, y la subtipificación; actualmente la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) permite la identificación genética de los aislamientos a nivel de serovar (Levett, 2004; OIE, 2008).

La necesidad de tener un diagnóstico rápido y directo ha llevado al desarrollo de numerosos ensayos de PCR, cuya ventaja es la obtención de un diagnóstico definitivo, sensible y específico, desde la fase aguda a la convaleciente de la enfermedad e incluso antes de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas convencionales, y se basan en la identificación de genes presentes en *Leptospira* como *rrs*, *secY*, *lipL32*, *ligB2*, *ligA*, *rpoB*, entre otros; el ADN de *Leptospira* se amplifica a partir de suero, orina, humor acuoso, LCR y un gran número de tejidos como riñón e hígado, utilizando

iniciadores para todas las especies patógenas y saprófitas (Budihal y Perwez, 2014; Hernández-Rodríguez et al., 2014).

Un limitante de la PCR es la inhabilidad para identificar el serovar infectante, lo cual no tiene mucha importancia para el manejo de un paciente pero si tiene un valor epidemiológico y para la salud pública significativo, porque puede indicar la fuente de infección y los reservorios, y así llevar a cabo métodos de prevención y control adecuados. El diseño de herramientas como la PCR en tiempo real (qPCR), la PCR anidada, el análisis de restricción de endonucleasas (REA), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el análisis de secuencias de locus múltiples (MLST) y el análisis de repeticiones en tándem de número variable en locus múltiples (MLVA), entre otros han mostrado buenos resultados en la clasificación de *Leptospira* (Levett, 2001).

3. METODOLOGÍA

3.1 Localización

Puerto López es uno de los municipios con mayor producción de cerdos en el departamento del Meta, con una población total de 93.615 porcinos para el 2015 según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Es considerado como el centro del país, tiene una extensión total de 6.740 Km², limitando por el norte con los municipios de Cumaral, Cabuyaro y el departamento de Casanare, por el este con el municipio de Puerto Gaitán, por el oeste con el municipio de San Carlos De Guaroa y con Villavicencio, y por el sur con el municipio de San Martín (Figura 2). Tiene una temperatura promedio de 26° C, una altitud que no supera los 178 msnm y una humedad relativa promedio del 77%. Se encuentra a 206 km de Bogotá (Alcaldía de Puerto López-Meta, 2015).



Figura 2. Municipio de Puerto López, Meta. Fuente: Google Maps. (2015).

El estudio se realizó en una granja porcina ubicada en la vereda La Serranía del municipio de Puerto López, en el departamento del Meta, Colombia. Para la selección de la granja se tuvo en cuenta que algunos animales de pie de cría y ceba provenían de otra granja de la misma empresa ubicada en San Antonio

del Tequendama, en la cual se realizó previamente un estudio (Ospina-Pinto y Rincón, 2013) donde se aisló *Leptospira* spp. en el 26.6% (8/30) de las muestras de orina cultivadas; paralelamente, se obtuvo un 73.3% (22/30) de positividad por MAT y se encontró que los animales positivos a *Leptospira* spp. tienen mayor riesgo de presentar alteraciones reproductivas.

Adicionalmente, la selección de la granja se justificó porque estos sistemas de producción reúnen factores de riesgo asociados con leptospirosis, como la presencia de roedores, el consumo de agua a partir de nacimientos naturales, la presencia de otros animales domésticos como caninos y silvestres como zorros, y la presentación de alteraciones reproductivas como abortos y repeticiones de celo.

3.2 Población y muestra

La población de porcinos está dividida en las diferentes etapas del ciclo productivo en machos reproductores (N= 7), hembras reproductoras (N= 337), lechones lactantes (N= 260), cerdos en el área de pre cebo (N= 407), y animales en el área de levante y ceba (N= 72). Se consideraron como fuentes de agua todas aquellas que sean para el consumo o estén en contacto con los animales de las diferentes etapas del ciclo productivo, siendo las siguientes: tanques de almacenamiento, mangueras y chupos. El origen del agua para estas fuentes es a partir de pozos profundos y nacimientos naturales.

Los criterios de inclusión y exclusión para la población de porcinos se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión en porcinos.

Criterio de inclusión	Criterios de exclusión
Animales pertenecientes a la especie porcina	Animales de otras especies
Porcinos de la granja en estudio	Porcinos de otras granjas
Porcinos de cada etapa del ciclo	Porcinos de una sola etapa del ciclo
Porcinos no vacunados contra leptospirosis hace menos de 6 meses	Porcinos vacunados contra leptospirosis hace menos de 6 meses
Porcinos que no hayan recibido antibióticos mínimo en 2 semanas	Porcinos que hayan recibido antibióticos mínimo en 2 semanas

La muestra de los porcinos se calculó a partir de una prevalencia del 50%, teniendo en cuenta que no existen datos reportados previamente (Hernández, Fernández y Baptista, 2010) en el municipio, y un nivel de confianza del 95%, por medio de la siguiente fórmula tomada del programa Win Episcopo 2.0:

$$n = \left[1 - (1 - NC)^{1/d} \right] \left[\frac{N - (d - 1)}{2} \right]$$

donde,

n= tamaño de la muestra requerido

N= tamaño de la población

d= prevalencia mínima esperada

NC= nivel de confianza

Para determinar la muestra en roedores se utilizó una prevalencia del 99% teniendo en cuenta los resultados del estudio realizado en Villavicencio por Morales et al. (2007). El nivel de confianza utilizado fue del 95% y un error aceptado del 5%. Se utilizó la fórmula reportada por Aguilar-Barojas (2005):

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

donde,

n= tamaño de la muestra requerido

Z= nivel de confianza

p = proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia

q = proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno ($1-p$)

d = nivel de precisión absoluta

Según los cálculos, la muestra a estudiar estuvo conformada por porcinos: machos reproductores ($n= 2$), hembras reproductoras ($n= 20$), lechones lactantes ($n=15$), cerdos en el área de pre cebo ($n= 24$), animales en el área de levante y ceba ($n= 4$); roedores ($n= 16$); y fuentes de agua ($n= 15$).

3.3 Métodos y procedimientos

3.3.1 Diseño metodológico

El estudio es observacional de tipo transversal, porque es un estudio epidemiológico que se limitó a medir las variables definidas, sin que intervengan los investigadores y sin incluir un grupo control (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). El método de estudio fue analítico, debido a que se establecieron relaciones entre las variables y se probaron hipótesis específicas, y cuantitativo porque se evaluaron datos numéricos.

Previo a los procedimientos metodológicos (Figura 3), el propietario de la granja conoció y firmó un consentimiento informado (Anexo 1), aceptando la toma de muestras.



Figura 3. Flujograma procedimientos metodológicos generales.

3.3.2 Toma de muestras en porcinos

En todas las etapas del ciclo productivo se seleccionaron los porcinos a los que se les tomó una muestra de sangre de la vena cava anterior en tubos Vacutainer®, que se almacenaron a 4°C y fueron conservadas hasta su análisis mediante la prueba de MAT. Igualmente, se tomaron muestras de orina mediante micción espontánea en tubos Falcon® estériles para el aislamiento a través de cultivo (Cárdenas-Marrufo et al. 2011; Miraglia et al., 2008; Morales et al., 2007). En los dos muestreos realizados, se tomaron un total de 65 muestras de sangre y orina (2 machos reproductores, 20 hembras reproductoras, 15 lechones lactantes, 24 cerdos en el área de pre cebo, y 4 animales en el área de levante y ceba).

3.3.3 Captura de roedores

Para la captura de los roedores, se identificaron las zonas estratégicas para la ubicación de las trampas (Figura 4 y 5), las cuales fueron: dentro de las instalaciones, alrededor de las instalaciones, entre la vegetación aledaña, cerca de desagües o alcantarillas, y alrededor de fuentes de agua; se usaron trampas tipo

Sherman y Tomahawk según la metodología reportada por Agudelo-Flórez et al. (2009) para la captura de roedores, utilizando cebos como atún, pescado enlatado en salsa de tomate, hojuelas de avena, granola y mantequilla de maní, y se ubicaron entre las 6 de la tarde y las 6 de la mañana en las zonas identificadas en los diferentes sitios del ciclo productivo (Giraldo et al., 2002b; Romero-Vivas et al., 2013a).



Figura 4. Ubicación trampas para roedores.



Figura 5. Trampas para roedores con cebo.

3.3.4 Muestras de agua

Se midió el pH y se tomaron muestras de agua en tubos Falcon® estériles de las diferentes fuentes identificadas previamente en cada uno de los sitios de las etapas del ciclo productivo. En total se tomaron 15 muestras de agua: 1 manguera para el lavado de los machos reproductores, 1 manguera para el lavado de las hembras reproductoras, 5 de un *pool* de los chupos de cada etapa, y 8 de los tanques de almacenamiento que distribuyen el agua a cada uno de los sitios de la

granja, para realizar el cultivo microbiológico (Francois et al., 2013; Giraldo et al., 2002a; Gummow et al., 1999; Gutiérrez, 2013).

3.3.5 Prueba de MAT

De las muestras de sangre, se obtuvieron los sueros por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos y se almacenaron a -20°C en tubos de microcentrífuga hasta su análisis. Para la prueba de MAT, se enfrentaron los sueros con 13 cepas de referencia de *Leptospira* donadas por el ICA, que corresponden a los serovares: Pomona, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Hardjo bovis, Hardjo prajitno, Canicola, Grippotyphosa, Sejroe, Copenhageni, Panama, Autumnalis, Cynoptery y Ballum; y se consideraron positivos los sueros con títulos $\geq 1:100$ (Cárdenas-Marrufo et al. 2011; Ochoa et al., 2000).

3.3.6 Cultivo microbiológico

Para el procesamiento microbiológico de las muestras de orina de porcinos y agua (Figura 6) se realizó el protocolo descrito por Miraglia et al. (2008); Hernández-Rodríguez et al. (2008) y Hernández-Rodríguez et al. (2011).



Figura 6. Revisión cultivos.

3.3.7 Antisueros

Los cultivos positivos a *Leptospira* spp. se enfrentaron a los 10 antisueros procedentes del *Royal Tropical Institute* en Holanda, que corresponden a los serovares: Bratislava, Hardjo, Ballum, Sejroe, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Autumnalis, Tarassovi, Pomona y Grippotyphosa; para identificar los serogrupos presentes en los cultivos realizando la metodología reportada por Bourhy et al. (2013), y Romero, Blanco y Galloway (2009).

3.3.8 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de orina y agua, y de 1 mL de los cultivos positivos a *Leptospira* (Figura 7) utilizando el QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y el protocolo reportado Hernández-Rodríguez et al. (2011), y el producto obtenido se conservó a -20°C.



Figura 7. Extracción de ADN de cultivos positivos.

3.3.9 PCR

Los análisis moleculares se realizaron con el ADN extraído de las muestras de orina porcina, de las muestras de agua y de los cultivos positivos a *Leptospira* spp. de las diferentes muestras colectadas (Figura 8) utilizando el procedimiento descrito por Hernández-Rodríguez et al. (2011), Hernández-Rodríguez et al. (2014), Moreno y Agudelo-Flórez (2010), y Romero-Vivas et al. (2013b).



Figura 8. PCR de muestras y cultivos positivos.

Para amplificar el producto de 482 pb del gen *rrl* se utilizaron los siguientes primers: *forward* (5'GCAAGCATTACCGCTTGTGG3') y *reverse* (5'TGTTGGGAAATCATACGAAC3), y para el producto de 423 pb del gen *lipL32* fueron: *forward* (5'-CGC TGA AAT GGG AGT TCG TAT GAT T-3') y *reverse* (5'-CCA ACA GAT GCA ACG AAA GAT CCT TT-3'). Posteriormente, estos productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con HydraGreen™, se utilizó el

marcador de peso molecular HyperLadder™ IV de 100pb, y se visualizaron en un transiluminador (Labnet) con luz UV.

3.4 Diseño estadístico

El estudio se relaciona con un diseño no experimental, y cada uno de los animales tuvo las mismas posibilidades de ser seleccionado. Las variables se analizaron mediante estadística descriptiva, utilizando frecuencias como proporción o porcentaje y resumen de datos en gráficas; y con estadística inferencial se realizarán pruebas de asociación como Chi cuadrado (χ^2). La tabla 2 muestra las variables respuesta que se analizaron.

Tabla 2. Variables respuesta a medir en el estudio.

Variable	Naturaleza	Nivel de medición	Unidad de medida
Aglutinación de al menos el 50% de leptospiras por microscopía de campo oscuro	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o Negativo
Presencia de la bacteria en cultivo	Cualitativa	Dicotómica	Positivo o Negativo
Título mayor para los serogrupos probables de <i>Leptospira</i>	Cualitativa	Nominal	Pomona, Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Grippotyphosa, entre otros
Detección gen <i>lipL32</i> en muestras y aislamientos positivos	Cualitativa	Dicotómica	Patógena o saprófita
Género	Cualitativa	Dicotómica	Macho o hembra
Etapas del ciclo productivo	Cualitativa	Nominal	Machos reproductores, hembras reproductoras, lechones en lactancia, lechones en pre-cebo y cerdos de levante y ceba
Fuentes de agua	Cualitativa	Nominal	Fuentes identificadas en cada etapa
Especie de roedor sinantrópico asociada a determinado serovar	Cualitativa	Nominal	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Mus musculus</i> y <i>Rattus rattus</i>
Lugar de captura	Cualitativa	Nominal	Lugares identificados en cada etapa

4. RESULTADOS

4.1 Condiciones generales de la granja y población

En la granja las diferentes etapas del ciclo productivo se encontraron aproximadamente con 500 metros entre cada una. Las fuentes de agua estaban distribuidas en 8 tanques de almacenamiento ubicados en la parte más alta de la granja y por medio de mangueras llevaban el agua para el lavado de las instalaciones en cada una de las etapas. En la zona de machos reproductores y hembras reproductoras se utilizaban mangueras para el lavado de los animales previo a la recolección de semen y a la inseminación artificial. En todas las etapas del ciclo productivo se utilizaban chupos para el consumo de agua por los animales (Figura 9). El pH de las muestras de agua colectadas fue de 7.5 en promedio.

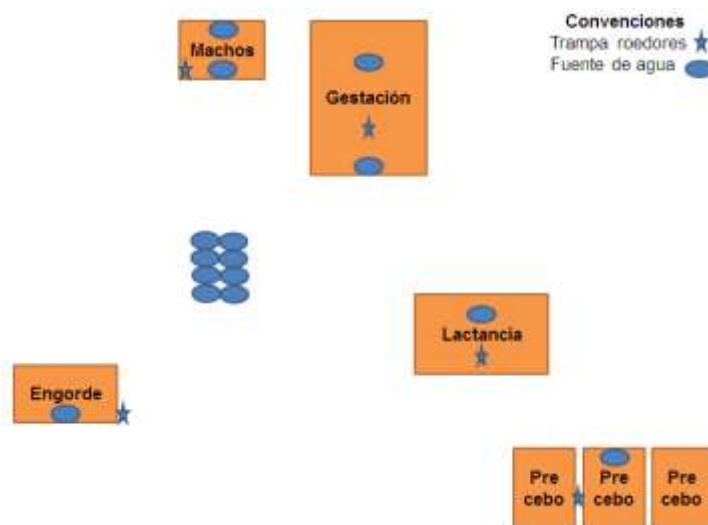


Figura 9. Plano de la granja porcina, ubicación trampas de roedores y fuentes de agua.

No se logró la captura de ningún roedor en las 5 trampas dispuestas durante 3 días. Tampoco se observaron indicios de presencia de roedores como heces o señales de actividad como formación de madrigueras, superficies roídas o presencia de residuos de comida y basura, o la misma observación de los animales. De acuerdo con lo reportado por los trabajadores de la granja, la población de ofidios en esta zona es alta y se constituyen en depredadores de roedores, limitando su presencia o actividad.

4.2 Prueba de Micro aglutinación

El 89.2% (58/65) de los sueros porcinos fue positivo al menos a un serogrupo de *Leptospira* spp. por MAT; los restantes fueron negativos, a los 13 serogrupos utilizados en la prueba, en un 10.7 % (7/65). El serogrupo más frecuente fue Grippotyphosa con el 39.6% (23/58), seguido por Canicola 36.2% (21/58), Pomona 34.4% (20/58), Copenhageni 22.4% (13/58), Icterohaemorrhagiae 20.6% (12/58), Cynoptery 15.5% (9/58), Hardjo bovis 15.5% (9/58), Bratislava 13.7% (8/58), Autumnalis 10.3% (6/58), Ballum 5.1% (3/58), Sejroe 5.1% (3/58), Panama 3.4% (2/58) y Hardjo prajitno con el 1.7% (1/58).

De los sueros positivos, el 72.4% (42/58) presentaron títulos contra dos o más serogrupos, y estos títulos variaron entre 100 a 3200, como se muestra en la figura 10.

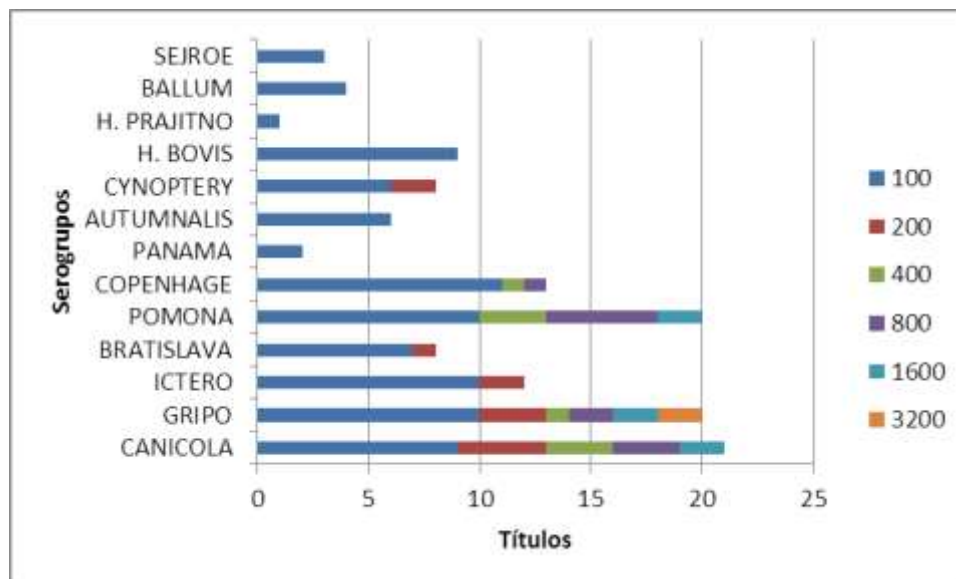


Figura 10. Títulos de anticuerpos frente a los diferentes serogrupos de *Leptospira* incluidos para el MAT realizado en los sueros de porcinos.

Respecto a las diferentes etapas del ciclo productivo, los lechones de precebo fueron la etapa con mayor porcentaje de animales positivos con el 39.6% (23/58), seguido por las hembras reproductoras con el 27.5 % (16/58), por lechones lactantes con el 22.4% (13/58), animales del área de levante con el 6.8% (4/58), y los machos reproductores con el 3.4% (2/58); por género el 60.3% (35/58) de los animales positivos fueron hembras y el 39.6% (23/58) fueron machos.

4.3 Aislamiento a través de cultivo

El 25% (20/80) de los cultivos de orina de porcinos y agua fueron positivos a *Leptospira* spp. De estos, el 5% (1/20) correspondieron a hembras reproductoras, el 5% (1/20) a machos reproductores, el 30% (6/20) a lechones de

precebo, el 5% (1/20) a lechones lactantes, el 5% (1/20) a cerdos del área de levante, y el 50% (10/20) a las diferentes fuentes de agua, de las cuales 2 fueron de la etapa de engorde, 3 de la etapa de hembras reproductoras, 2 de la etapa de lechones lactantes, 2 de la etapa de machos reproductores, y 1 de la etapa de precebo. Además, en cuanto al género el 30% (6/20) de los cultivos positivos fueron de hembras y el 20% (4/20) de machos. En la figura 11 se muestra un cultivo semisólido positivo a *Leptospira* spp., en el cual se evidencia la formación del anillo de Dinger característico del crecimiento de la bacteria en este medio.

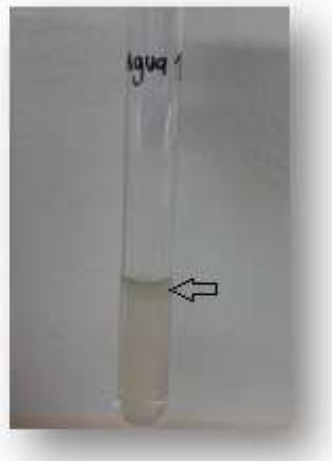


Figura 11. Cultivo de agua positivo a *Leptospira* spp. (la flecha señala el anillo de Dinger).

4.4 Clasificación serológica de los aislamientos

De los 20 cultivos positivos a *Leptospira* spp. enfrentados a los antisueros del *Royal Tropical Institute* el 45% (9/20) fueron positivos al menos a un antisuero y el 55% (11/20) no reaccionaron frente a ninguno de los 10 antisueros utilizados, mientras que el 25% (5/20) reaccionaron contra dos o más. De los 10 antisueros, el que reaccionó en mayor cantidad frente a las cepas fue *Icterohaemorrhagiae*

con el 66.6% (6/9), seguido por *Canicola* con el 44.4% (4/9), *Grippotyphosa* con el 33.3% (3/9), *Sejroe* con el 22.2% (2/9), *Hardjo bovis* con el 11.1 % (1/9), y *Ballum* con el 11.1% (1/9), mientras que Bratislava, Tarassovi y Pomona no reaccionaron con ninguna cepa.

Teniendo en cuenta las etapas del ciclo productivo, el 44.4% (4/9) de los cultivos que reaccionaron frente a los antisueros fueron de precebo, el 11.1% (1/9) fueron machos reproductores, y el 11.1% (1/9) fueron lechones lactantes, mientras que de las otras etapas las cepas no reaccionaron contra ningún antisuero. Por género, 4 de los cultivos que reaccionaron eran de hembras y 2 de machos; adicionalmente, los 3 cultivos restantes que reaccionaron contra los antisueros correspondieron a fuentes de agua, 2 de la etapa de hembras reproductoras y 1 de la etapa de lechones lactantes.

4.5 Análisis molecular

En el 100% (20/20) de los cultivos positivos se observó un fragmento de 482 pb que corresponde al gen *rrl* (Figura 12) que identifica el género *Leptospira* spp. El 30% (6/20) de los cultivos positivos y confirmados por PCR fueron de precebo, el 5% (1/20) correspondieron a machos reproductores, y el 5% (1/20) a lechones lactantes. Para hembras reproductoras y animales de engorde se encontró respectivamente un 5% (1/20) de positividad en las pruebas moleculares. En cuanto a los resultados moleculares para los cultivos positivos de agua se encontró que en el 50% (10/20) se observó la banda de 482 correspondiente al género *Leptospira*. La distribución de estas muestras correspondió a 3 aislamientos confirmados por PCR de la etapa de hembras, 2 la etapa de lechones

lactantes, 2 de machos reproductores, 2 de engorde, y 1 de pre cebo. Por género, el 30% (6/20) de los cultivos positivos a PCR fueron de hembras y el 20% (4/20) de machos.



Figura 12. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de cultivos positivos de muestras de orina y fuentes de agua para el gen *rrl* (482 pb). Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control positivo; línea 3: control negativo; líneas 4 a 23: banda de 482 pb que confirma la presencia de *Leptospira* spp. en cultivos positivos de orina de porcinos y fuentes de agua.

En el 50% (10/20) de los cultivos positivos se observó un fragmento de 423 pb que corresponde al gen *lipL32*, como se muestra en la figura 13. El 50% (5/10) de los positivos fueron hembras y el 20% (2/10) machos, y el resto cultivos de agua con un 30% (3/10) que correspondían a 1 de la etapa de lechones lactantes, 1 de la etapa de hembras reproductoras y 1 de los machos reproductores. En el ciclo productivo, 4 animales de pre cebo, 1 hembra reproductora, 1 lechón lactante, 1 macho reproductor, mientras que en engorde no hubo ningún positivo para este gen.

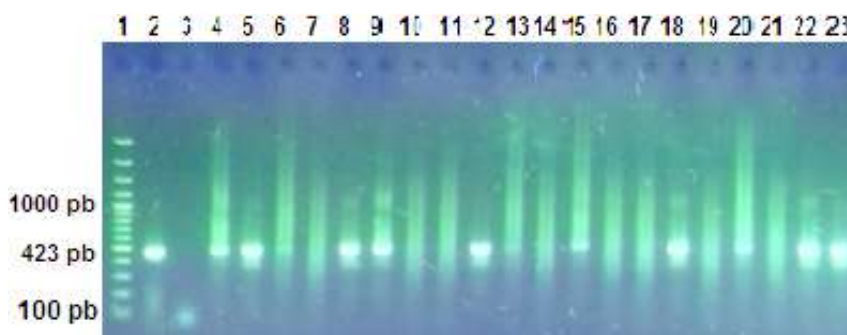


Figura 13. Electroforesis de cultivos positivos para el gen *lipL32*.

Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, control positivo; línea 3 control negativo; línea 4, cultivo positivo de hembra reproductora positivo a *lipL32*; línea 5, cultivo positivo de pre cebo 10 positivo a *lipL32*; líneas 6 y 7, cultivos positivo de pre cebo 5 y 6 negativos a *lipL32*; línea 8, cultivo positivo de pre cebo 21 positivo a *lipL32*; línea 9, cultivo positivo de lechón lactante 10 positivo a *lipL32*; líneas 10 y 11, cultivos positivo de agua 1 y 2 negativos a *lipL32*; línea 12, cultivo positivo de agua 12 positivo a *lipL32*; línea 13, cultivo positivo de agua 15 negativo a *lipL32*; línea 14, cultivo positivo de engorde 4 negativo a *lipL32*; línea 15, cultivo positivo de macho 2 positivo a *lipL32*; líneas 16 y 17, cultivos positivos de agua 13 y 14 negativos a *lipL32*; línea 18, cultivo positivo de pre cebo 16 positivo a *lipL32*; línea 19, cultivo positivo de agua 9 negativo a *lipL32*; línea 20, cultivo positivo de agua 10 positivo a *lipL32*; línea 21, cultivo positivo de agua 11 negativo a *lipL32*; línea 22, cultivo positivo de agua 6 positivo a *lipL32*; línea 23, cultivo positivo de pre cebo 12 positivo a *lipL32*.

En las muestras directas de orina de porcinos y fuentes de agua no se evidenciaron productos amplificados de los genes *rrl* y *lipL32*. En la tabla 3, se resumen el número de muestras positivas y negativas por antisueros, por cultivo y por PCR.

Tabla 3. Muestras positivas y negativas a los métodos diagnósticos convencionales y moleculares

Cultivo		Antisueros		PCR Cultivos Género <i>Leptospira</i>	
Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
20	60	9	11	20	0

Al realizar la prueba de χ^2 para relacionar las variables, no se encontraron diferencias significativas con el género, la etapa y los resultados de la prueba de MAT y el cultivo microbiológico (Tabla 4); al realizar la corrección de Yates para el caso del género, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con MAT ($P=0,87$) y con cultivo ($P=0,80$).

Tabla 4. Asociación género y etapa del ciclo con las pruebas diagnósticas

Prueba	MAT		Cultivo	
	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
Variable				
Género	0,32	0,98	0,01	0,99
Etapa	3,68	0,44	6,36	0,17

Las dos variables correspondientes a la presencia de roedores no fueron relacionadas, debido a que no se logró la captura de ningún roedor en la finca estudiada.

5. DISCUSIÓN

El municipio de Puerto López tiene una temperatura media entre 26 y 26.5°C, con un máximo de 28°C y un mínimo de 24°C, siendo óptimo para el crecimiento de *Leptospira* spp., además los muestreos se realizaron en lo que es considerado como época lluviosa, la cual se extiende de abril a noviembre; sin embargo, los meses de mayores precipitaciones son de mayo a julio (Alcaldía de Puerto López-Meta, 2016), lo cual también favorece el crecimiento de la bacteria. Estas altas temperaturas también ayudan a la supervivencia del microorganismo en las fuentes de agua, especialmente si se encuentra entre 25 y 30°C (Chavarría et al., 2015), condiciones que se encontraron en la granja y que facilitan la presencia de la bacteria en estos ambientes representando un riesgo para los animales y humanos de la granja.

Al relacionar el concepto de Una Salud con los resultados obtenidos, se debe reconocer que los microorganismos zoonóticos como *Leptospira* spp. están presentes y emergiendo en comunidades rurales como la del presente estudio, y que su emergencia es espacial y temporalmente variable; además, la mayoría de las personas que viven en áreas de alto riesgo no son conscientes del peligro o de lo que pueden hacer para mitigarlo, debido a que la transmisión puede exacerbarse por prácticas de manejo de los animales, inadecuada manipulación de los alimentos y del agua. Igualmente, las estrategias de recolección de datos deben incluir la evaluación espacial, temporal y los patrones demográficos de la prevalencia del patógeno y de la enfermedad en humanos y animales, y el papel

del agua en la transmisión de enfermedades y emergencia de zoonosis, el cual debe ser ampliamente explorado (Mazet et al., 2009).

La importancia del clima, especialmente los patrones de lluvia, tienen influencia sobre las poblaciones de roedores, especialmente se modifican las condiciones de alimentación porque la duración de la lluvia afecta la vegetación y esta es la principal fuente de comida, siendo crucial para su supervivencia y reproducción (Makundi et al. 1999). Los cebos utilizados fueron los reportados por autores que realizaron trabajos similares con resultados exitosos en cuanto a la captura (Agudelo-Flórez et al., 2009; Romero-Vivas et al., 2013a); sin embargo, como aparentemente la población de roedores es escasa, los cebos no tuvieron efecto para atraer a estos animales.

Dentro del control biológico de los roedores, uno de los depredadores más comunes son los ofidios, aunque también se mencionan otros reptiles, mamíferos como perros y gatos domésticos, y medianos silvestres, y aves (rapaces), que están ejerciendo un papel en la regulación natural de estas especies de animales sinantrópicos, y con mayor razón si hay altas poblaciones de estos depredadores existe concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio donde a pesar de haber ubicado 5 trampas con cebos durante 3 días no se logró capturar ningún animal (Poleo, Rodríguez y Garbi, 2006); por lo tanto, si se mantienen las poblaciones de este tipo de fauna silvestre benéfica para las unidades productivas como es el caso de estos depredadores vertebrados, es posible regular la población de roedores y de esta forma controlar la transmisión de microorganismos como *Leptospira* spp.

Conjuntamente, se puede sugerir que en la granja se está presentando el fenómeno de depredación natural, según lo mencionado por los trabajadores, el cual está siendo utilizado en la actualidad como una alternativa viable para el control de plagas de animales vertebrados en varios países, siendo incluso más eficiente que los métodos químicos y físicos, y aunque se deben realizar estudios sobre la tasa de depredación de los ofidios, estas han sido subestimadas como depredadores de roedores en diferentes sistemas productivos, y no sólo contribuyen a la reducción de su población sino que lo realizan en situaciones específicas debido a que los buscan en sus madrigueras y sitios de anidación (Noor, 1994).

Además, los roedores pueden alterar sus patrones de alimentación para evitar a los depredadores, ya que se han realizado estudios en los cuales se evidencia que estos animales evitan áreas con olor a orina y heces de ciertos depredadores mientras que sus actividades son normales en áreas donde únicamente perciben olores de otros animales que no actúan como depredadores, y tienen adaptaciones de comportamiento, por ejemplo con los depredadores aves, disminuyen su actividad y la extensión de su hábitat y utilizan la vegetación como cubierta para reducir su vulnerabilidad (Jonsson et al., 2000; McDonald et al., 1999); esto ratifica los resultados obtenidos, pues es posible que al tener una población alta de ofidios y aves en la zona de la granja, los roedores los perciban y esto contribuyó a que no se lograra su captura durante el desarrollo de la fase de campo del trabajo.

La diversidad de enemigos naturales para los roedores puede explicar la regulación y limitación de su población, e incluso autores como Krebs (1999) afirman que cuando la población de roedores incrementa, se debe a una disminución de la población de depredadores, ya sea de manera artificial o natural. Sin embargo, no se puede atribuir únicamente la limitación de la población a los depredadores, también factores como la territorialidad puede hacer que la población se disperse, los parásitos u otros agentes infecciosos que pueden afectar a los roedores, o la escasez de alimento, esto quiere decir que los depredadores pueden ser el nivel final en la cadena trófica más que la causa primaria de los cambios en la población debido a que la tasa de reproducción de roedores es tan alta que es imposible que la disminución sea atribuida exclusivamente a estos depredadores (Krebs, 1999).

En los llanos orientales, donde se encuentra Puerto López, se ha registrado la presencia de mamíferos medianos como el zorro (*Cerdocyon thous*) y el tigrillo (*Leopardus pardalis*), que cumplen un papel en los ecosistemas como reguladores de poblaciones ya que dentro de su dieta normal se encuentran los roedores (Guzmán-Lenis y Camargo-Sanabria, 2004); sin embargo, la presencia de estas especies depredadoras también se debe tener en cuenta porque pueden ser transmisoras de microorganismos, y para el caso del presente estudio posiblemente pueden estar contaminando las fuentes de agua con *Leptospira* spp. y ser una potencial fuente de infección para los porcinos de la granja, aunque esto no se comprobó en esta investigación es importante realizar estudios para conocer el papel de estos animales silvestres debido a que se ha reportado que múltiples

especies de mamíferos e incluso de aves y reptiles son portadoras de *Leptospira* spp. (Leirs et al., 2004).

Adicionalmente, los cambios en la dinámica de las poblaciones de roedores se pueden explicar con modelos que incluyen los patrones y abundancia de las precipitaciones, la intensidad de la depredación, las variaciones en la cantidad y calidad del alimento disponible, el estado nutricional de las plantas que consumen que también se ve afectado por las condiciones meteorológicas, entre otros factores que influyen la variabilidad geográfica y temporal de la densidad de población de roedores, los patrones de reproducción y las características del hábitat incluyendo la cubierta y estructura de la vegetación (Makundi et al., 2009); además, la interacción depredador-presa explica la existencia de los ciclos poblacionales y determina la abundancia y distribución de los depredadores y de las presas, y autores como Guidobono (2013) afirman que es falsa la teoría de que las poblaciones de depredadores sólo consumen el excedente de los roedores y este se puede recuperar por reproducción, porque si la depredación se mantiene durante épocas en las que no hay reproducción no puede haber una respuesta reproductiva compensatoria.

En cuanto a la seroprevalencia encontrada en porcinos (89.2%) ésta concuerda con la obtenida por Anampa et al. (2012) en cerdos provenientes de granjas tecnificadas (89.6%) en Perú; fue superior a lo reportado en otras investigaciones como la de Orrego et al. (2001) realizada en Colombia donde se encontró un 67.6% y la realizada en Argentina por Gualtieri et al. (2010) con un 28.2%. La diferencia en las seroprevalencias se puede explicar porque en las

granjas donde existen fallas reproductivas hay mayor probabilidad de encontrar animales con títulos positivos (Miller et al., 1990), como fue el caso de la granja estudiada cuyo criterio de selección fue la presentación de alteraciones reproductivas como abortos y repeticiones de celo, e igualmente se puede atribuir a otros factores como la endemidad de la región, y específicamente por las prácticas de manejo en las granjas, entre otros. Adicionalmente, la mayor seroprevalencia encontrada en este estudio también se puede explicar por la batería diagnóstica utilizada, que presenta un mayor número de serogrupos de *Leptospira*; pues algunos autores explican las bajas seroprevalencias por la presencia de falsos negativos ocasionados por la falta de serogrupos en la batería diagnóstica, también puede tratarse de animales portadores que ya no tienen títulos de MAT como sugiere Delbem et al. (2002) que a pesar de haber encontrado una prevalencia del 66,67% en su estudio, la mayoría se atribuye al serogrupo Icterohaemorrhagiae. Otro factor que puede explicar las diferencias en la seroprevalencia son los puntos de corte, algunos autores utilizan 1:100 y otros por ejemplo Candelo y Hidalgo (2002) utilizan 1:400 afirmando que con niveles de anticuerpos superiores la bacteria está circulando de forma activa en la granja.

El serogrupo de mayor presentación fue Grippotyphosa, contrario a lo reportado no sólo en el país sino en el mundo para la especie porcina, donde Pomona y Bratislava tienen como huésped de mantenimiento a los cerdos (Burriel et al., 2003), y en este caso se obtuvieron serovares menos reportados en porcinos como Copenhageni, que raramente se ha encontrado en cerdos de unidades intensivas del mundo; sin embargo, estos dos serovares tienen como

huésped de mantenimiento a la fauna silvestre, desde roedores hasta primates, armadillos, felinos, entre otros, generando infección incidental en los cerdos (Ellis, 2012; Romero, Sánchez y González, 2011). Por lo tanto, si se tiene en cuenta las características de la región y la presencia de animales silvestres se puede explicar el alto porcentaje de los serovares Grippotyphosa y Copenhageni, encontrado en esta granja. Así la presencia de animales silvestres en la zona puede estar desempeñando un papel significativo en la transmisión y explicar lo que está ocurriendo particularmente en esta granja.

En África, Assenga et al. (2015) encontraron prevalencias a *Leptospira* spp. del 29.96% en humanos, 30.37% en bovinos, 8.47% en caprinos, 28.95% en búfalos (*Syncerus caffer*), 20.29% en roedores (*Aesthomya chrysophilus*, *Dasmys incommisus*, *Gerbilliscus vicinus*, *Mastomys natalensis*, *Rattus rattus*, *Lemniscomys griselda* y *Lemniscomys rosalia*) y 9.09% en musarañas (*Crocidura hirta*), señalando el riesgo de transmisión de *Leptospira* spp. por compartir fuentes de agua, e hicieron énfasis en que los resultados serológicos sirven para conocer el estado de infección en las diferentes especies pero no dicen si el animal está eliminando la bacteria por la orina y no permiten hacer comparaciones sobre el papel epidemiológico de la contaminación por leptospiras en fuentes de agua; por lo tanto, se deben complementar los resultados serológicos con análisis bacteriológicos y PCR, tal como se realizó en el presente estudio.

Es común encontrar animales positivos a varios serovares (72.4%) si se tiene en cuenta que las reacciones cruzadas son frecuentes ya que muchas veces se sobre interpretan los datos serológicos así se use una batería de cepas que

incluya un gran número de serogrupos para identificar alguno que no sea común o no se haya reportado en la región; adicionalmente, otro factor importante es la posibilidad de infección con múltiples serovares, ya que se podría predecir el serovar infectante pero a veces los serogrupos incluyen varios serovares similares, y cuando en el panel se usan serovares de un mismo serogrupo lo más probable es que se presente reacción cruzada en los resultados (Levett, 2003).

En Venezuela, encontraron una prevalencia de 47,07% a *Leptospira*, con variación de los serogrupos en las granjas, resaltando la importancia de realizar estudios sobre el perfil de esta enfermedad en las granjas para determinar si se presentan cambios en el tiempo respecto a la prevalencia y posibles nuevos serogrupos, lo cual puede ayudar en la selección de la adecuada batería de antígenos para la prueba serológica y para elegir las vacunas apropiadas y orientar las medidas de prevención y control (Mejía et al., 2012).

Que no se haya aislado el agente en animales positivos a MAT, se puede explicar porque los títulos serían de contacto, también porque la infección es reciente y por esto el animal tiene títulos altos sin haber desarrollado colonización renal, por el pequeño número de leptospiras en la muestra insuficiente para el éxito del aislamiento, o porque los animales estuvieron infectados, presentaron o no la enfermedad y eliminaron el agente, teniendo en cuenta que en las infecciones por serovares no adaptados, el periodo de portador renal es más corto (Shimabukuro et al., 2003).

Con respecto a los aislamientos obtenidos en este estudio, se encontró un alto porcentaje, 25% (20/80), si se tiene en cuenta que el aislamiento a través de cultivo es complejo y dispendioso y que estudios similares reportan un mayor número de muestras con menos aislamientos como el llevado a cabo en Montería, Córdoba, Colombia, por Calderón y colaboradores (2013), donde se obtuvieron 3 aislamientos de 171 muestras de porcinos; según Freitas et al. (2004) aunque la mayoría de la información disponible sobre leptospirosis es a partir de serología, el diagnóstico definitivo lo da el aislamiento, el cual es difícil de realizar debido al largo periodo de incubación que necesita la bacteria, y porque el tiempo entre la obtención y el procesamiento de las muestras debe ser menor a 3 horas. En la presente investigación se obtuvo un alto porcentaje de aislamientos, favorecido posiblemente porque las muestras se procesaron aproximadamente 2 horas después de la toma y se realizó siembra en la granja.

De igual forma, en otro estudio realizado en animales aparentemente sanos en Tanzania, sólo se aisló *Leptospira* spp. en el 0.8% de las muestras de orina de porcinos, principalmente porque la contaminación fue alta por parte de microorganismos como cocos de crecimiento rápido, bacilos y algunos protozoos (Kessy et al, 2010). En este trabajo, la contaminación se limitó con el uso de antibióticos como el 5-fluoracilo; además, la realización de subcultivos facilitó la reducción de contaminantes y la obtención de los 20 aislamientos.

En otro estudio realizado en Brasil por Miraglia et al. (2008) de 22 cerdas, sólo el 4.5% fueron positivas a *Leptospira* a partir de orina, cabe señalar que existen pocos estudios de aislamiento de *Leptospira* en porcinos a partir de orina;

sin embargo, la importancia del aislamiento a partir de orina es que estos animales están eliminando el microorganismo al ambiente, principalmente a fuentes de agua, presentando un riesgo para otros animales y para los humanos que se encuentran en las granjas.

Por otra parte, los cultivos positivos se clasificaron hasta nivel de serogrupo mediante la prueba de MAT, de los cuales el 45% reaccionaron frente a los antisueros, estos resultados sugieren la circulación de los serogrupos encontrados así como recalcan la necesidad de incluirlos en las formulaciones vacunales existentes; cabe señalar que este método serológico sigue siendo ampliamente utilizado a pesar de que en la actualidad existen pruebas moleculares para la tipificación de cepas de *Leptospira* (Cuba-Romero et al., 2016).

En una investigación realizada por Rivera et al. (2012) sobre la diversidad de aislamientos peruanos de *Leptospira*, encontraron que la mayoría de los resultados de la clasificación de estos aislamientos coincidieron a nivel de serogrupo entre MAT y PFGE, por lo tanto estos autores recomiendan utilizar ambas técnicas, ya que en el caso de MAT se pueden presentar algunas reacciones cruzadas entre serogrupos de cercana relación genética y en el caso de la PFGE no se puede diferenciar entre *Icterohaemorrhagiae* y *Copenhageni*, como ha sido reportado por diversos autores como Romero et al. (2009), porque estos serovares son similares genéticamente y al realizar esta prueba el patrón de banda obtenido es similar, resaltando la importancia del presente estudio en el que se realizó aislamiento y confirmación por PCR.

De los cultivos positivos a *Leptospira*, el 55% no reaccionó frente a ningún antisuero; por un lado, puede ser que la cepa aislada sea saprófita, o por el otro, que corresponda a un serogrupo que no estaba incluido en los antisueros utilizados. En un estudio realizado por Perolat y colaboradores (1998) en Australia, donde entre otras pruebas utilizaron MAT con 26 antisueros de serogrupos patógenos y saprófitos para identificar cepas de *Leptospira* aisladas de cerdos, encontraron que una cepa no aglutinó con ninguno de estos y por lo tanto no pertenecía a ningún serogrupo conocido, proporcionando evidencia de uno nuevo, que designaron como Hurstbridge, del cual produjeron el antisuero que también probaron contra las cepas de referencia y luego de nuevo con los aislamientos y así lo identificaron, corroborando su singularidad con pruebas moleculares.

El antisuero que más reacción tuvo entre los aislamientos fue Icterohaemorrhagiae, en contraste con lo obtenido por Miraglia et al. (2015) donde el más frecuente fue Pomona a partir de aislamientos de porcinos enfermos y aparentemente sanos mediante serotipificación, obteniendo los mismos resultados que las técnicas moleculares como VNTR (Análisis de repeticiones en tándem de número variable), PFGE y MLST, aunque estos métodos proporcionan más información incluso hasta nivel de cepa.

Algunos cultivos positivos (25%) reaccionaron contra dos o más antisueros, esto se puede presentar porque en ese cultivo se podían encontrar leptospiras de diferentes serogrupos o también por reacción cruzada, como reportan Villanueva et al. (2014) en cuyo estudio encontraron que una rata (*Rattus norvegicus*) albergaba diferentes tipos de *Leptospira* en su riñón y en su orina, aislamiento que

se identificó por pruebas moleculares como serovar Manilae mientras que el aislamiento de orina se identificó como serovar Losbanos. Los autores señalan que la epidemiología de los serovares de *Leptospira* se puede afectar por cambios en la distribución o abundancia de los reservorios animales, por la introducción de nuevos serovares por medio del transporte de animales o por migraciones naturales.

Es ampliamente conocido que el gen *lipL32* (423 pb) está presente de forma exclusiva en especies patógenas de *Leptospira* (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010), esto se confirmó en los 10 aislamientos obtenidos de orina de porcinos y agua; en Colombia, son pocos los estudios que se han realizado utilizando pruebas moleculares. Se ha reportado por Bolívar et al. (2012) una prevalencia del 34% en porcinos para *L. interrogans* mediante PCR, resaltando que esta prueba molecular detecta el ADN de *Leptospira* mientras que los métodos serológicos como MAT detectan anticuerpos.

Igualmente, Calderón et al. (2013) identificaron como cepas patógenas 3 aislamientos de porcinos mediante PCR, amplificando un producto de 423 pb del gen *lipL32*; estos datos concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, de esta forma, se establece la importancia de esta técnica molecular que frente al cultivo, es rápida, sensible y específica, y existe una variedad de ensayos para identificar genes universales como *rrs*, *secY*, *Gryb*, o genes de especies patógenas como *lipL32*, *lfb1*, *ligA* y *ligB2*. Estudios en otras latitudes han mostrado la efectividad de las estrategias moleculares en la identificación de *Leptospira*; en un estudio realizado en el municipio de Circasia, Colombia, se determinó la

prevalencia de *Leptospira* en 120 porcinos en las diferentes etapas del ciclo productivo, los autores encontraron que el 22.5% fueron positivos, y que la etapa productiva si es determinante para la presentación de leptospirosis porcina, recomendando realizar un plan de vacunación y de control de roedores, estrictas medidas de bioseguridad, y estrategias como la disminución de la humedad en las instalaciones (Medina, Negrete y Almenteros, 2003).

Hamond et al. (2014) realizaron ensayos de PCR en muestras de orina de diferentes especies como una herramienta útil para detectar portadores de *Leptospira* en ganado, y encontraron que de 15 cerdos estudiados, 5 (33.3%) fueron positivos, y que los resultados serológicos y moleculares fueron discrepantes; sin embargo, se debe tener en cuenta que las dos metodologías se realizaron en diferentes muestras, MAT en suero y PCR en orina, y que MAT es indirecto y PCR directo. Estos hallazgos pueden explicar las diferencias encontradas en los resultados de MAT y PCR del presente estudio.

Para la eficacia de los resultados de la PCR se debe tener en cuenta que en la orina se encuentran sustancias como la urea que pueden inhibir la prueba molecular; por lo tanto, el procesamiento de las muestras para realizar esta técnica es crítico y se debe ajustar al tipo de muestra y especie muestreada, para evitar que animales positivos puedan estar pasando como falsos negativos, ya que las bacterias se pueden lizar durante el almacenamiento de la orina y el ADN se puede perder en el sobrenadante después de la centrifugación que permite concentrar el microorganismo; por consiguiente, es necesario neutralizar las muestras de orina inmediatamente después de la toma para evitar perder el ADN

(Lucchesi et al., 2004). Las muestras obtenidas para la realización del presente estudio fueron neutralizadas con PBS (Buffer fosfato salino).

El uso de pruebas moleculares tanto en muestras animales como ambientales ha permitido mejorar la identificación de la bacteria alrededor del mundo; sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de ensayo de PCR ya que algunos sólo identifican si es patógena o saprófita, otros identifican especies o incluso cepas realizando su posterior secuenciación. La PCR identifica el ADN de la bacteria, esto significa que no necesariamente las bacterias tienen que estar viables y transmisibles; además, como la eliminación de la bacteria por orina es intermitente, que un animal resulte negativo mediante esta prueba no descarta el diagnóstico y se deben tener en cuenta diversos factores a la hora de interpretarla como la inadecuada conservación de la muestra, la extracción y los posibles inhibidores de la PCR para los cuales se incluye un control positivo, como en el presente estudio (Martin, Arauz y Stanchi, 2015).

Otra investigación realizada en Colombia por Romero-Vivas et al. (2013b), donde tomaron 3 aislamientos de *Leptospira* de 383 porcinos muestreados (0.8%) y realizaron PCR para detectar cepas patógenas, encontrando el fragmento de 423 pb de *lipL32* en los tres aislamientos, resaltando la importancia de identificar la bacteria en diferentes regiones para realizar las medidas de control apropiadas y entender la epidemiología de la enfermedad, ya que por lo general no se realiza este tipo de diagnóstico por el lento crecimiento de la bacteria que puede ser hasta de 2 meses, por los requerimientos de esta durante el cultivo como la temperatura, oscuridad y suplementos específicos, la contaminación frecuente con otros

microorganismos como cocos y bacilos, y por el alto costo de los reactivos necesarios para el cultivo y las pruebas moleculares; además, a estas cepas en un futuro se les podrían realizar otras pruebas más específicas con la PFGE, y como otros autores han recomendado el uso de cepas locales de la bacteria para obtener mayor sensibilidad en las pruebas serológicas como MAT, estos aislamientos podrían servir para establecer un panel de cepas para mejorar el diagnóstico de la enfermedad en el país.

Específicamente de las muestras de agua, se obtuvo un número alto tanto de aislamientos (10/15) como de positivos por PCR a *rrl* (10/10) y a *lipL32* (3/10) teniendo en cuenta que en otros estudios como el llevado a cabo por Cárdenas-Marrufo (2011) en granjas en México no obtuvieron ningún positivo por PCR, posiblemente por factores que pueden afectar el ensayo como los inhibidores enzimáticos del ambiente, daño y degradación de ADN de la muestra o la época en que fueron obtenidas las muestras, teniendo en cuenta que la lluvia y la temperatura ambiental puede afectar la supervivencia de la bacteria, lo que puede ocasionar una reducción en el número de células bacterianas presentes en las aguas superficiales.

En el presente estudio no se obtuvo ningún resultado positivo para PCR de las muestras directas de agua y orina de porcinos; esto se puede explicar porque la extracción de estas muestras directas se realizó en el laboratorio de la granja, que a pesar de que se trataba de un lugar cerrado, cuyas superficies fueron limpiadas previamente, se utilizaron los elementos de barrera como bata, guantes, tapabocas y gorro, y durante todo el procedimiento se intentó al máximo mantener

todas las condiciones de asepsia, no es lo mismo que haberlo realizado en un laboratorio de biología molecular bajo condiciones controladas y en una cámara de flujo laminar donde se cuenta con un ambiente estéril como es recomendado y si es posible utilizar luz ultravioleta antes de empezar el procedimiento, ya que el ADN es sensible a DNAsas que se pueden encontrar en el ambiente (Falcón y Valera, 2007).

Adicionalmente, se puede justificar la posible degradación o que se haya afectado la calidad del ADN extraído durante el transporte de las muestras, porque desde el momento de la finalización de la extracción y durante el transporte hasta Bogotá la temperatura de las muestras de ADN obtenidas fue aproximadamente de 5°C, y se recomienda que las muestras para diagnóstico de PCR se mantengan entre -20° y -70°C para conservar el ADN (Rådström et al., 2004).

El resultado negativo de estas muestras se atribuye a la extracción de ADN y no a fallas en la PCR que hayan generado falsos negativos, debido a que por haber utilizado un control positivo en la técnica, como es recomendado ampliamente y que en este caso tuvo un resultado correcto, se puede confirmar que no se trató de inhibidores de la PCR y si de errores durante la extracción, o que la cantidad y calidad de ADN en las muestras estaba por debajo del límite detectable o que eran negativas (Bal et al., 1994; Martin et al., 2015); para mejorar estos resultados se puede optimizar el pre procesamiento de las muestras de orina para la técnica o realizar procedimientos como la utilización de perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos antileptospira para mejorar la detección de esta en la muestra (OIE, 2008), y algunos autores como Schreier et al. (2013)

recomiendan realizar pasos de purificación del ADN posteriores a la extracción, ya que para el caso de las muestras de agua reportan baja positividad cuando se realizan ensayos en muestras de casos asociados a leptospirosis.

Los cultivos de agua y de orina de porcino que fueron positivos se obtuvieron en todas las etapas del ciclo productivo, permitiendo inferir que las fuentes de agua pueden ser el posible origen de transmisión para los porcinos, así como un riesgo para los trabajadores de esta granja. Estos resultados coinciden con reportes para Colombia que evidencian que en granjas porcinas se han aislado leptospiras de bebederos, pozos y aguas residuales en un 17% (9/54), identificando dos como patógenas con el gen *lipL32*, una de un bebedero y otra residual, y teniendo en cuenta que la mayoría de los casos en humanos se adquieren a partir de fuentes de agua (Monahan et al., 2009; Ganoza et al., 2006) esto propicia el desarrollo de futuras investigaciones para saber si están contaminadas con leptospiras patógenas y así realizar las intervenciones apropiadas al tener un diagnóstico previo (Calderón et al., 2013).

Para la estandarización de la prueba de PCR convencional, Moreno y Agudelo-Flórez (2010) utilizaron entre otras muestras 5 aislamientos de aguas ambientales, y reconocieron el gen *secY* en 2 muestras de agua, pero las 5 fueron negativas para *lipL32*, demostrando que se trataban de cepas saprófitas, las cuales se encuentran de manera frecuente en muestras ambientales al igual que las 7 encontradas en el presente estudio con el gen *rrt*; sin embargo, existe la opción que los cultivos que no dieron por *lipL32* se traten de cepas no sólo saprófitas sino también intermedias, o incluso se trate de una nueva especie de

Leptospira como encontraron Saito et al. (2013) a partir del aislamiento de muestras de agua en Japón.

Las especies intermedias de *Leptospira* son diferentes de la patógenas y saprófitas de acuerdo a secuenciación del gen 16S rRNA, y todavía no ha sido demostrada su virulencia ni su patogenicidad en humanos ni animales, resaltando la importancia de usar *primers* que detecten genes como el *rrl*, utilizado en el presente estudio, ya que con *primers* específicos de especies patógenas no se estarían identificando especies consideradas intermedias como *L. fainei*, que ha sido aislada de porcinos y humanos, y en los últimos años se han reportado casos de infección en humanos en Europa, señalando la relevancia de su aislamiento e identificación en muestras humanas, animales y ambientales (Martin et al., 2015; Levett et al., 2006).

A pesar de la utilidad del gen *rrl* para identificar si los aislamientos corresponden al género *Leptospira*, autores como Aviat et al. (2009) resaltan que estos ensayos de PCR específicos de género no se deberían utilizar en muestras de agua, debido a que en éstas usualmente se encuentran leptospiros saprófitas, lo cual fue comprobado en su investigación donde encontraron que el 96% de las muestras de agua estudiadas fueron identificadas como leptospiros saprófitas por PCR; sin embargo, enfatiza que las fuentes de agua naturales ofrecen buenas condiciones de crecimiento para las cepas saprófitas y también podrían ofrecer un ambiente ideal para la supervivencia de cepas patógenas; de esta forma, ellos confirman un 4% de cepas patógenas en fuentes de agua que estaban relacionadas con la presentación de casos en humanos, siendo importante el

desarrollo de pruebas para evaluar la viabilidad de estas leptospiros patógenas en muestras de agua.

En Chile, describieron la ocurrencia de *Leptospira* patógena en 12 de 83 fuentes de agua para animales, y asociaron que la presencia de otros animales como caninos y roedores en las granjas explica los datos observados aumentando la probabilidad de obtener fuentes positivas (Muñoz-Zanzi et al., 2014). La contaminación de los sistemas de agua que pueden estar expuestos a animales portadores de *Leptospira* en la orina se da por factores como el mal diseño y construcción de la reserva de agua, el inadecuado almacenamiento y mantenimiento del fluido, y los malos controles de calidad de los factores mencionados; por lo cual, para la prevención es importante hacer énfasis en el control de animales domésticos como caninos, ferales como felinos y roedores, teniendo en cuenta que realizar pruebas para *Leptospira* en muestras de agua no es un procedimiento comúnmente realizado, y que el cultivo es limitado porque no se sabe si se trata de una cepa saprófita, mientras que la PCR sí diferencia patógenas de saprofitas pero no se ha desarrollado un protocolo aceptado de manera universal o realizado de rutina para realizar pruebas en muestras de agua (Wynwood et al., 2014).

Esta bacteria puede sobrevivir hasta por 6 meses en ambientes acuosos con escasos nutrientes antes de la transmisión a un huésped, gracias a las interacciones con bacterias ambientales y a la formación de biopelículas, ya que se ha encontrado que en cultivos en conjunto con *Sphingomonas* spp. se permite la supervivencia de *L. biflexa* y *L. meyeri* hasta por un año, y adicionalmente, *L.*

interrogans tiene la capacidad de formar biopelículas regulada por la disponibilidad de nutrientes, los cuales contienen microorganismos viables y tienen una rápida disolución cuando los nutrientes están disponibles para facilitar las oportunidades de interactuar con los tejidos de huéspedes; además, las leptospiras patógenas comparten la mayoría de rutas metabólicas con las saprófitas que están altamente adaptadas a la vida afuera del huésped, y la persistencia de las patógenas en agua depende de un pH ligeramente alcalino, bajas concentraciones de bacterias heterotróficas, alto oxígeno, y bajas concentraciones de sal (Barragán, 2011).

En otro estudio realizado en granjas de cerdos en Colombia, se aisló *Leptospira* a través de cultivo en el 14,2% (35/247) de aguas para consumo y lavado como tanques de almacenamiento y bebederos, y en 9,4% (3/32) de aguas servidas, y los aislamientos fueron evaluados mediante diferentes técnicas de diferenciación como el crecimiento a 13°C, la presencia de 8-azaguanina, la conversión de células esféricas en NaCl, y el crecimiento en caldo tripticosa de soya (TSB), pero no pudieron ser clasificadas ni como *L. interrogans* ni como *L. biflexa*, sugiriendo que se puede tratar de una especie intermedia; también encontraron que los tanques son la fuente más importante, debido a que suelen estar destapados y se pueden contaminar fácilmente con orina de animales portadores como caninos y roedores; adicionalmente, de estos tanques se saca el agua para los bebederos y las mangueras convirtiéndose en fuente de contaminación, por esto se recomienda tapar los tanques, tratar el agua con químicos, y poner barreras que impidan el acceso de los animales (Giraldo et al., 2002a).

Brihuega et al. (2012) afirman que tanto las leptospiras patógenas como saprófitas son capaces de producir biopelículas, que consisten en una comunidad de bacterias en una matriz extracelular adherida a una superficie, la cual proporciona protección de los cambios ambientales. Los investigadores además evaluaron la capacidad de formación de biopelículas de un aislamiento de *L. interrogans* serovar Pomona, obtenido de un feto porcino abortado, y de *L. biflexa* serovar Patoc, usando microscopía de luz polarizada, inmunofluorescencia y microscopía electrónica de barrido para evaluar el proceso *in vitro*, concluyendo que las biopelículas y las agregaciones celulares son consistentes con la vida de las leptospiras saprófitas en agua y pueden ayudar a las patógenas a colonizar el huésped y ocasionar aborto a los animales gestantes.

Las diferencias en la capacidad de percepción ambiental por las variaciones en el genoma de *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* sugieren que la pérdida de funciones de transducción de señales de *L. borgpetersenii* ha disminuido su supervivencia por fuera del huésped, mientras que *L. interrogans* ha mantenido estas funciones para facilitar su transmisión a través del agua; Picardeau et al. (2008) identificaron los genes involucrados en la supervivencia en aguas superficiales mediante la secuencia del genoma de dos *L. biflexa*, y también reportaron que la biopelícula juega un papel importante en los portadores crónicos animales de *L. interrogans* facilitando la colonización en los túbulos renales, y además, que los genes involucrados en la biosíntesis de alginato están presentes en *L. biflexa* y *L. interrogans* pero no en *L. borgpetersenii* por lo que su supervivencia es menor.

Romero-Vivas et al. (2013b) identificaron dos aislamientos de 54 muestras de agua provenientes de granjas porcinas, que dieron positivo para *lipL32*, resaltando la importancia de clasificar la bacteria proveniente de estas fuentes de agua debido a que si se encuentran especies patógenas esto representa un riesgo para los animales y humanos de la zona; otra utilidad de realizar esta caracterización es que los aislamientos de agua se pueden usar para el serodiagnóstico de leptospirosis en animales y humanos como lo han planteado Addamiano y Babudieri desde 1968, ya que estas cepas pueden generar aglutinación en titulaciones altas con sueros de pacientes infectados.

En general la mayoría de los animales positivos fueron hembras, 60.3% contra 39.6% de los machos por MAT y 30% contra 20% de los machos por los cultivos positivos; sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la prueba de X^2 y la corrección de Yates no hay diferencias significativas en cuanto al sexo; Bolívar et al. (2012) obtuvieron resultados similares pues en su estudio encontraron una prevalencia mayor en hembras (29%) que en machos (16%), e igualmente en la investigación de Kessy et al. (2010) de 385 porcinos el 64.7% fueron hembras y el 35.3% fueron machos, y al realizar el análisis estadístico con la prueba de X^2 tampoco encontraron significancia entre el sexo y ser positivos por MAT, resaltando la importancia de *Leptospira* como causa de enfermedad en todos los animales de cría de las granjas porcinas, ocasionando alteración de los indicadores reproductivos y por lo tanto afectando la economía de los porcicultores.

Los resultados de este estudio no reflejaron diferencias significativas entre la etapa del ciclo reproductivo y los resultados de MAT; sin embargo, es importante señalar que en todas las etapas se encontraron animales positivos tanto por MAT como por cultivo. La etapa que más animales positivos tuvo para las dos pruebas fue pre cebo, 39.6% por MAT y 30% de los cultivos positivos; estos resultados concuerdan con lo reportado por Jung et al. (2009) en donde buscaron determinar si la seroprevalencia a *Leptospira* estaba relacionada con la edad, y para esto tomaron muestras de 3 grupos: lechones (<10 semanas de edad), cerdos en crecimiento (≥ 10 semanas hasta <17 semanas) y cerdos de engorde (≥ 17 semanas), y encontraron seroprevalencias de 0.9%, 5.8% y 16.2%, respectivamente; además, estos autores afirman la hipótesis de que la seroprevalencia tiende a aumentar con la edad por el uso de antibióticos en la alimentación, debido a que los lechones y los cerdos en crecimiento generalmente se alimentan con concentrados que incluyen antibióticos dentro de su fórmula mientras que a los cerdos de engorde no se les suministran este tipo de alimentos.

Suepaul et al. (2011) también utilizaron la prueba de X^2 al determinar la seroprevalencia de leptospirosis en ganado, y en general no encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad y el sexo en ovejas, cabras y cerdos, pero si en bovinos donde la edad fue un factor asociado para la seropositividad a *Leptospira* ($P=0.026$), siendo los bovinos mayores de un año los que tuvieron una seroprevalencia más alta, confirmando que a medida que la edad aumenta también lo hace la seropositividad; estas diferencias se pueden presentar por las distintas prácticas de manejo entre los animales jóvenes y los mayores, ya que generalmente los jóvenes se mantienen en corrales y los mayores se dejan pastar,

teniendo mayor potencial de exposición. En el caso de los cerdos, otra hipótesis puede ser que cuando lechones se encuentran con sus camadas y con un número menor de animales mientras que a medida que crecen se van mezclando los grupos y tienen mayor contacto con otros animales que provienen de otras camadas, teniendo así más exposición, o por el uso de antibióticos en la alimentación, como se mencionó anteriormente (Suepaul et al., 2011).

Kessy et al., (2010) también confirman en granjas porcinas la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en los animales de todos los grupos de edad estudiados, 29.4% en cerdos menores de un año, 41.2% en cerdos entre 1 y 2 años, y 29.4% en cerdos de 2 años o más; sin embargo, al realizar la asociación estadística, la edad no tuvo diferencias significativas con la frecuencia de anticuerpos frente a *Leptospira* ($P=0.83$), pero se observó que los cerdos más jóvenes eran menos positivos, esto puede suceder posiblemente porque los animales mayores han vivido más tiempo en el ambiente y por esto pueden haber estado más expuestos a potenciales fuentes de infección (Kessy et al., 2010).

Naito et al. (2007) emplearon ELISA y MAT encontrando que la prevalencia de anticuerpos en hembras reproductoras fue más alta que en cerdos de engorde, una posible explicación puede ser que las hembras reproductoras están más expuestas a ambientes contaminados que los cerdos de engorde, lo que puede influir en los títulos de anticuerpos frente a *Leptospira*, resaltando que para el control de la enfermedad es esencial detectar la ruta de transmisión de la bacteria a los cerdos con seguimiento continua a través de aislamiento de la bacteria a partir de la orina de los cerdos. Además, debido a que los antibióticos suministrados en el concentrado pueden interferir con el aislamiento de *Leptospira*

es primordial hacer el esfuerzo por aislar la bacteria de cerdos a los que no se les ha realizado terapia antibiótica.

A partir de los resultados encontrados en el presente estudio en los porcinos y en las fuentes de agua, que evidenciaron mediante el uso de antisueros la presencia del serogrupo Canicola para los aislamientos obtenidos en los dos tipos de muestra, se puede sugerir la transmisión de la bacteria entre las fuentes de agua y los porcinos en la etapa de lechones, y el riesgo potencial para los humanos en esta granja. Martins y Lilenbaum (2013) señalan que el conocimiento básico de los serogrupos y sus huéspedes de mantenimiento es necesario para entender la epidemiología de la enfermedad; además, la leptospirosis humana usualmente se debe a serovares que son mantenidos por las poblaciones animales de la región que propagan la bacteria en el ambiente, reforzando la teoría de la compleja relación epidemiológica que existe entre la leptospirosis humana y animal, por lo que el estudio de la leptospirosis en animales está directamente relacionado con el conocimiento y la prevención de la infección en humanos.

Los resultados obtenidos para MAT concuerdan con los resultados de la clasificación de los aislamientos con antisueros, pues los serogrupos Icterohaemorrhagiae (20.6%) y Canicola (36.2%) se encontraron en gran proporción en todo el ciclo productivo, y frente a estos reaccionaron la mayoría de los aislamientos positivos de agua y de orina de los porcinos. De esta manera, se evidencia la importancia de la clasificación de la bacteria debido a que además de *L. interrogans* otras especies patógenas como *L. kirschneri* pueden causar

enfermedad tanto en animales como en humanos, y a pesar de los escasos reportes se han encontrado títulos de anticuerpos frente a *L. kirschneri* en humanos sanos y en otros mamíferos como los caninos que presentan infecciones asintomáticas hasta enfermedad inespecífica con signos clínicos como diarrea, letargia y deshidratación (Obiegala et al., 2016).

La revisión sistemática de Allan y colaboradores (2015) sobre ésta enfermedad zoonótica desatendida y el paradigma de Una Salud, señala que en la epidemiología de la leptospirosis hay más de una fuente potencial de infección en cada escenario, y usando éste enfoque integrado se proporcionaría evidencia invaluable para cuantificar el impacto directo e indirecto de la enfermedad en poblaciones humanas y animales. Generalmente, las medidas de control para prevenir la leptospirosis se enfocan en los roedores; sin embargo, esta revisión y el presente estudio demuestran que los animales domésticos también son importantes huéspedes de *Leptospira* spp. y pueden jugar un papel sustancial en la transmisión a los humanos.

6. CONCLUSIONES

Con la realización del estudio exploratorio de *Leptospira* spp. en porcinos y agua mediante métodos diagnósticos convencionales y moleculares en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta, Colombia, se encontró la presencia de la bacteria en los porcinos y en las fuentes de agua en todas las etapas del ciclo de producción, ésta evidencia puede sugerir que *Leptospira* spp. se está transmitiendo entre los porcinos y la fuentes de agua en esta granja.

Los serogrupos de *Leptospira* spp. en los porcinos de la granja que se identificaron por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) fueron Grippytyphosa (23/58), Canicola (21/58), Pomona (20/58), Copenhageni (13/58), Icterohaemorrhagiae (12/58), Cynoptery (9/58), Hardjo bovis (9/58), Bratislava (8/58), Autumnalis (6/58), Ballum (3/58), Sejroe (3/58), Panama (2/58) y Hardjo prajitno (1/58). La seroprevalencia encontrada en los porcinos de la granja fue del 89.2% (58/65).

La frecuencia de *Leptospira* spp. a partir del aislamiento a través del cultivo fue del 25% (20/80) en orina de porcinos y agua, siendo el 50% (10/20) respectivamente para muestras de agua y orina de porcinos en todas las etapas del ciclo productivo. Se resalta la importancia de identificar los animales portadores, que están propagando la bacteria al ambiente, y las fuentes de agua, que pueden estar transmitiendo *Leptospira* spp. a los porcinos y humanos de la granja.

Se confirmó la presencia de *Leptospira* spp. en los aislamientos de orina de porcinos y agua mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), encontrando que en el 100% (20/20) de los cultivos positivos se observó un fragmento de 482 pb que corresponde al gen *rrl* que identifica el género *Leptospira* spp. En el 50% (10/20) de estos cultivos se observó un fragmento de 423 pb que corresponde al gen *lipL32*, exclusivo de especies patógenas. Estos resultados evidencian la presencia de la bacteria en los porcinos y en el agua reflejando el riesgo potencial como fuentes de infección. También refuerza la importancia de utilizar las pruebas moleculares en la identificación de especies patógenas y saprófitas de *Leptospira* spp. en este tipo de muestras.

7. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Según los resultados obtenidos, para futuras investigaciones, que se realicen en lugares alejados del laboratorio de biología molecular, se recomienda garantizar la temperatura de las muestras de ADN durante el transporte, ya que esta debe ser entre -20° y -70°C , o si es posible realizar los diferentes procedimientos en un laboratorio que se encuentre lo más cerca posible de la granja. En cuanto a la prueba de MAT, aumentar el panel diagnóstico con mayor cantidad de serogrupos. De igual forma, educar a los trabajadores de la granja sobre medidas de prevención y el riesgo al que están expuestos, así como brindarles los elementos de bioseguridad apropiados. A los animales portadores identificados que están propagando la bacteria al ambiente se les debe hacer seguimiento y terapia antibiótica con estreptomicina o eritromicina. Igualmente, se recomienda realizar tratamiento a las fuentes de agua que están en contacto y sean de consumo para humanos y animales en la granja. Finalmente, mejorar la metodología y el esfuerzo de muestreo para la captura de roedores.

Como perspectivas del trabajo, realizar estudios en animales silvestres y domésticos como caninos para conocer el papel de estas especies en la epidemiología de enfermedad, así como el diagnóstico de la enfermedad en humanos, para establecer una posible relación en la interfaz humano-animal-ambiente. Posteriormente, también se puede realizar la identificación de los aislamientos con pruebas moleculares como la PFGE, y crear un panel diagnóstico de MAT con aislamientos locales para mejorar el serodiagnóstico de la enfermedad.

8. LISTA DE REFERENCIAS

- Addamiano, L., Babudieri, B. (1968). Water Strains of *Leptospira* in the Serodiagnosis of Human and Animal Leptospirosis. *Bull. Org. mond. Santé*, 39, 925-934.
- Adler, B., De la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and Leptospirosis, *Veterinary Microbiology*, 140, 287- 296.
- Agudelo-Flórez, P., Londoño, A., Quiroz, V., Ángel, J., Moreno, N., Loaiza, E., Muñoz, L., Rodas, J. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), 906-910.
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud, *Salud en Tabasco*, 11 (1-2), Enero-Agosto, 333-338.
- Anampa, L., Rivera, H., Falcón, N., Arainga, M., Ramírez, M. (2012). Frecuencia de *Leptospira* spp. en porcinos de crianza tecnificada y de traspatio beneficiados en dos mataderos de Lima, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23 (2), 240-245.
- Alcaldía de Puerto López-Meta, Sitio oficial de Puerto López en Meta, Colombia. Tomado el 13 de mayo de 2016, www.puertolopez-meta.gov.co
- Almenteros, C., Arrieta, G., Máttar, S., Barguil, A., Tamayo, L., Padilla, T., Bedoya, Z., Mendoza, S., Estereta, F., Díaz, N., Estrada, C., Medina, A., Rodríguez, A., De la Ossa, M., Pérez, A., Ríos, R. (2004). Seroprevalencia de Leptospirosis porcina en el Departamento de Córdoba, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17 (2), 141-147.
- Allan, K., Biggs, H., Halliday, J., Kazwala, R., Maro, V., Cleaveland, S., Crump, J. (2015). Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9 (9), 1-25.
- Arrieta, G., Rodríguez, V., Calderón, A. (2010). Seroepidemiología de *Leptospira* spp., en porcinos de algunos municipios del Sinú medio, departamento de Córdoba - Colombia, *Revista MVZ Córdoba*, 15 (1), 2023-2024.
- Assenga, J., Matemba, L., Muller, S., Mhamphi, G., Kazwala, R. (2015). Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9 (3), 1-14.
- Aviat, F., Blanchard, B., Michel, V., Blanchet, B., Branger, C., Hars, J., Mansotte, F., Brasme, L., De Champs, C., Bolut, P., Mondot, P., Faliu, J., Rochereau, S., Kodjo, A., Andre-Fontaine, G. (2009). *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 463-476.

- Bal, A., Gravekamp, C., Hartskeerl, R., Meza-Brewster, J., Korver, H., Terpstra, W. (1994). Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (8), 1894-1898.
- Barragán, V., Mejía, M., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R., Haake, D., Trueba, G. (2011). Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water, *Current Microbiology*, 62, 1802-1806.
- Bello, S., Rodríguez, M., Paredes, A., Mendivelso, F., Walteros, D., Rodríguez, F., Realpe, M.E. (2013). Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011, *Biomédica*, 33, 153-60.
- Bolívar, S., Lagares, A., Varela, L., Vergara, C. (2012). Prevalencia de *Leptospira interrogans* por PCR, en la población porcina del municipio de Baranoa-Atlántico (Colombia), *Revista Colombiana de Ciencias de la Salud*, 1 (1), 11-19.
- Bourhy, P., Herrmann Storck, C., Theodose, R., Olive, C., Nicolas, M., Hochedez, P., Lamaury, I., Zinini, F., Brémont, S., Landier, A., Cassadou, S., Rosine, J., Picardeau, M. (2013). Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7 (3), 1-10.
- Brihuega, B., Samartino, L., Auteri, C., Venzano, A., Caimi, K. (2012). *In vivo* cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina, *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 138-143.
- Budihal, S., Perwez, K. (2014). Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8 (1), 199-202.
- Burriel, A., Varoudis, L., Alexopoulos, C., Kritas, S., Kyriakis, S. (2003). Serological evidence of *Brucella* species and *Leptospira interrogans* serovars in Greek swine herds, *Journal of Swine Health and Production*, 11 (4), 186-189.
- Candelo, N., Hidalgo, M. (2002). Estudio serológico de tres patologías del tracto reproductivo de cerdas en granjas del estado Aragua, Venezuela, *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 12 (2), 108-112.
- Calderón, A., Rodríguez, V., Máttar, S., Arrieta, G. (2013). Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics, *Tropical Animal Health and Production*, 45 (7), DOI 10.1007/s11250-013-0508-y.
- Cárdenas-Marrufo, M., Vado-Solís, I., Pérez-Osorio, C., Segura-Correa J. (2011). Seropositivity to leptospirosis in domestic reservoirs and detection of *Leptospira* spp. from water sources, in farms of Yucatan, México, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14 (1), Enero-Abril, 185-189.
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22 (4), 290-307.
- Chavarría, L., Lara, D., Méndez, W., Moscoso, J. (2015). *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica, *Biociencias*, 10 (2), 65-80.
- Cristancho-Torres, D.S., Benítez-Cabrera, K.A., Góngora-Orjuela, A. (2012). Conocimientos sobre leptospirosis en estudiantes de veterinaria y seropositividad, Villavicencio, 2011. *Orinoquía*, 16(2), 118-124.

- Cuba-Romero, Y., Gainza-Santos, N., Batista-Santiesteban, N., Saltaren-Cobas, A., Naranjo-Medina, M. (2016). Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* para su uso en vacunas veterinarias, *VacciMonitor*, 25 (1), 5-11.
- Dechner, A. (2014). A retrospective analysis of the leptospirosis research in Colombia, *Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (3), 258-264.
- Delbem, A., Freitas, J., Bracarense, A., Müller, E., Oliveira, R. (2002). Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation, *Brazilian Journal of Microbiology*, 33,174-177.
- Ellis, W. (2006). Leptospirosis. En B. Straw, J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. Taylor, *Diseases of Swine* (pp. 691-799). Ninth Edition. USA: Blackwell Publishing.
- Ellis, W. (2012). Leptospirosis. En J. Zimmerman, L. Karriker, A. Ramirez, K. Schwartz, G. Stevenson, *Diseases of Swine* (pp. 2818-2849). 10th Edition. USA: Wiley-Blackwell.
- Falcón, L., Valera, A. (2007). Extracción de ácidos nucleicos. En L. Eguiarte, *Ecología molecular* (pp. 499-516). Primera edición. México: Instituto Nacional de Ecología.
- Feraud, D., Abeledo, M. (2005). Primer reporte en Cuba de *Leptospira interrogans* serovar *Tarassovi* y caracterización clínica epizootológica en focos de Leptospirosis porcina, *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 6 (4), 1-35.
- Freitas, J., Silva, F., Oliveira, R., Delbem, A., Muller, E., Alves, L., Teles, P. (2004). Isolation of *Leptospira* spp. from dogs, bovine and swine naturally infected, *Ciência Rural*, 34 (3), 853-856.
- Francois, S., Brihuega, B., Grune, S., Gattarello, V., Correa, C., Petrakovsky, J., Gualtieri, C., Arestegui, M. (2013). Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina, *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65 (2), 177-184.
- Ganoza, C., Matthias, M., Collins-Richards, D., Brouwer, K., Cunningham, C., Segura, E., Gilma, R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*, *PLoS Medicine*, 3 (8), 1329-1340.
- Giraldo, G., Orrego, A., Santacruz M. (2002a). Leptospirosis. Las aguas de la explotación porcina como vehículo de la *Leptospira*, en la zona central cafetera de Colombia, *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34 (1), 79-87.
- Giraldo, G., Orrego, A., Betancurth, A. (2002b). Los roedores como reservorios de *Leptospiras* en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia, *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34 (1), 69-78.
- Google Maps. Tomado el 13 de Mayo de 2015, <http://maps.google.com>
- Gualtieri, C., Arestegui, M., Besso, R., Pereyra, N., Sarradell, J., Gattarello, V., Poli, G., Peralta, L., François, S. (2010). Estudio serológico de leptospirosis en porcinos del sur de las provincias de Santa fe y Córdoba, Argentina, Memorias del X Congreso Nacional de Producción Porcina, Mendoza, Argentina, pp. 279.
- Guerra, M. (2013). Leptospirosis: Public health perspectives, *Biologicals*, 41, 295-297.

- Guidobono, J. (2013). Dinámica poblacional de roedores en agroecosistemas y su relación con variables ambientales. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas. Buenos Aires, Argentina.
- Gummow, B., Myburgh, J., Thompson, P., Van der Lugt, J., Spencer, B. (1999). Three case studies involving *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection in mixed farming units, *Journal of the South African Veterinary Association*, 70 (1), 29-34.
- Gutiérrez, B. (2013). Estandarización de un protocolo de recolección de muestras y PCR en Tiempo Real para la detección e identificación de especies de *Leptospira* patógenas en muestras de agua de río, Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de B.Sc. en Biotecnología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Guzmán-Lenis, A., Camargo-Sanabria, A. (2004). Importancia de los rastros para la caracterización del uso de hábitat de mamíferos medianos y grandes en el bosque Los Mangos (Puerto López, Meta, Colombia), *Acta Biológica Colombiana*, 9 (1), 11-22.
- Hamond, C., Martins, G., Loureiro, A., Pestana, C., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M., Lilenbaum, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock, *Veterinary Research Communications*, 38, 81-85.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, M. (2010). Concepción o elección del diseño de investigación. En Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, M., *Metodología de la Investigación* (pp. 118 – 169) Quinta Edición, México: Editorial McGraw Hill.
- Hernández-Rodríguez, P., Quintero, G., Díaz, C., Dalmau, E. (2008). Comparación del cultivo microbiológico y visualización por campo oscuro para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos de la Sabana de Bogotá, *Revista de Investigación, Universidad de La Salle*, 8 (1), 9-15.
- Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C., Dalmau, E., Quintero, G. (2011). A comparison between Polymerase Chain Reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of Leptospirosis in bovines, *Journal of Microbiological Methods, Elsevier*, 84, 1-7.
- Hernández-Rodríguez, P., Gómez A., Baquero M., Quintero, G. (2014). Identification of *ompL1* and *lipL32* Genes to Diagnosis of Pathogenic *Leptospira* spp. isolated from Cattle, *Open Journal of Veterinary Medicine*, 4, 102-112.
- Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2015). Censo Pecuario Nacional. Sitio oficial del Instituto Colombiano Agropecuario. Tomado el 20 de mayo de 2015, www.ica.gov.co.
- Instituto Nacional de Salud-INS. (2011). Protocolo de Vigilancia y Control de Leptospirosis, Grupo Enfermedades Transmisibles, Equipo Funcional Zoonosis, Vigilancia y Control en Salud Pública, 1-21.
- Jackson, P., Cockcroft, P. (2007). Polysystemic diseases. En P. Jackson y P. Cockcroft, *Handbook of Pig Medicine* (pp. 180-197) Primera Edición, Iowa, USA: Editorial Saunders Elsevier Health Sciences.

- Jobbins, S.E., Sanderson, C.E., Alexander, K.A. (2013). *Leptospira interrogans* at the Human–Wildlife Interface in Northern Botswana: A Newly Identified Public Health Threat. *Zoonoses and Public Health*, 61(2), 113-123.
- Jonsson, P., Koskela, E., Mappes, T. (2000). Does risk of predation by mammalian predators affect the spacing behaviour of rodents? Two large-scale experiments, *Oecologia*, 122, 487-492.
- Jung, B., Park, C., Lee, C., Jung, S. (2009). Seasonal and age-related seroprevalence of *Leptospira* species in pigs in Korea, *Veterinary Record*, 165, 345-346.
- Kessy, M., Machang'u, R., Swai, E. (2010). A microbiological and serological study of leptospirosis among pigs in the Morogoro municipality, Tanzania, *Tropical Animal Health and Production*, 42, 523-530.
- Krebs, C. (1999). Current Paradigms of Rodent Population Dynamics—What Are We Missing?. En G. Singleton, L. Hinds, H. Leirs, Z. Zhang, *Ecologically-based Rodent Management* (pp. 33-48). Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Naito, M., Sakoda, Y., Kamikawa, T., Nitta, Y., Hirose, K., Sakashita, M., Kurokawa, S., Kida, H. (2007). Serological Evidence of Leptospiral Infection in Pig Populations in Different Districts in Japan, *Microbiology and Immunology*, 51 (6), 593-599.
- Noda, A., Rodríguez, I., Rodríguez, Y., Govín, A., Obregón, A. (2014). Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos, *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66 (3), 447-452.
- Noor, H.M. (1994). Natural predation: A viable option for controlling vertebrate pest in Malaysia. *The Planter*, 70 (817), 161-172.
- Makundi, R., Oguge, N., Mwanjabe, P. (1999). Rodent Pest Management in East Africa—an Ecological Approach. En G. Singleton, L. Hinds, H. Leirs, Z. Zhang, *Ecologically-based Rodent Management* (pp. 460-476). Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Makundi, R., Massawe, A., Mulungu, L., Katakweba, A. (2009). Species diversity and population dynamics of rodents in a farm-fallow field mosaic system in Central Tanzania, *African Journal of Ecology*, 48, 313-320.
- Mazet, J., Clifford, D., Coppolillo, P., Deolalikar, A., Erickson, J. (2009). A “One Health” Approach to Address Emerging Zoonoses: The HALI Project in Tanzania, *PLoS Medicine*, 6 (12), 1-6.
- Martin, P., Arauz, M., Stanchi, N. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria, *Analecta Vet*, 3 (1), 26-38.
- Martins, G., Lilenbaum, W. (2013). The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions, *BMC Veterinary Research*, 9, 237.
- McDonald, Mathews, F., Berdoy, M. (1999). The Behaviour and Ecology of *Rattus norvegicus*: from Opportunism to Kamikaze Tendencies. En G. Singleton, L. Hinds, H. Leirs, Z. Zhang, *Ecologically-based Rodent Management* (pp. 49-80). Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.

- Medina, A., Negrete, L., Almenteros, C. (2003). Prevalencia de leptospirosis porcina en el municipio de Circasia (Quindío), *Revista MVZ Córdoba*, 8 (1), 281.
- Mejía, W., Zapata, D., Sánchez, A., Quintero, A., Torres, P., Chango, M., Padrino, T. (2012). Estudio serológico de la brucelosis y leptospirosis en granjas porcinas del municipio Mauroa del estado Falcón, Venezuela, *Revista de la Universidad del Zulia*, 3 (5), 43-60.
- Miller, D., Wilson, M., Owen, W., Beran, G. (1990). Porcine leptospirosis in Iowa, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2, 171-175.
- Miraglia, F., Moreno, A., Gomes, C., Paixão, R., Liuson, E., Morais, Z., Maiorka, P., Seixas, F., Dellagostin, O., Vasconcellos, S. (2008). Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo state, Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 501-507.
- Miraglia, F., Moreno, L., Morais, Z., Langoni, H., Shimabukuro, F., Dellagostin, O., Hartskeerl, R., Vasconcellos, S., Moreno, A. (2015). Characterization of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolated from swine in Brazil, *Journal of infection in developing countries*, 9 (10), 1054-1061.
- Monahan, A., Miller, I., Nally, J. (2009). Leptospirosis: Risks during recreational activities, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 707-716.
- Morales, R., Bravo, D., Moreno, D., Góngora, A., Ocampo, A. (2007). Asociación serológica de la infección por *Leptospira* en humanos, porcinos y roedores en una granja de Villavicencio-Colombia, *Revista Orinoquia*, 11 (2), 73-80.
- Moreno, N., Agudelo-Flórez, P. (2010). Aplicación de las Pruebas de PCR Convencional Simple y Múltiple para la Identificación de Aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(4), 548-556.
- Muñoz-Zanzi, C., Mason, M., Encina, C., González, M. (2014). Household Characteristics Associated with Rodent Presence and *Leptospira* Infection in Rural and Urban Communities from Southern Chile, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90 (3), 497-506
- Musso, D., La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46, 245-252.
- Langoni, H., Souza, L., Da Silva, A., Cunha, E., Da Silva, R. (2008). Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp. antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45 (3), 190-199.
- Leirs, H., Lodal, J., Knorr, M. (2004). Factors correlated with the presence of rodents on outdoor pig farms in Denmark and suggestions for management strategies, *Wageningen Journal of Life Sciences*, 52 (2), 145-161.
- Levett, P. (2001). Leptospirosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2), 296-326.
- Levett, P. (2003). Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis, *Clinical Infectious Diseases*, 36, 447-52.
- Levett, P. (2004). Leptospirosis: A forgotten zoonosis?, *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 435-448.

- Levett, P., Morey, R., Galloway, R., Steigerwalt, A. (2006). *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 671-673.
- Lucchesi, P., Arroyo, G., Etcheverría, A., Parma, A., Seijo, A. (2004). Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37 (2), 131-134.
- Obiegala, A., Woll, D., Karnath, C., Silaghi, C., Schex, S., Eßbauer, S., Pfeffer, M. (2016). Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (3), 1-12.
- Ochoa, J., Sánchez, A., Ruiz, I. (2000). Epidemiología de la Leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria, *Revista Panamericana de Salud Pública*, 7 (5), 1-7.
- Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE. (2008). Leptospirosis, Manual de la OIE sobre animales terrestres, 251-264.
- Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE. (2014). Leptospirosis, Manual de la OIE sobre animales terrestres, 1-15.
- Orrego, A., Giraldo, G., Bohórquez, A., Escobar, J., Quiceno, J., Ríos, B., Santafé, M., Hurtado, J. (2001). Aproximación a la prevalencia serológica real de la leptospirosis en porcinos-cría, *Revista Corpoica*, 3 (2), 11-16.
- Ospina-Pinto, M.C., Rincón, J.M. (2013). Relación de los indicadores reproductivos con la presencia de *Leptospira* spp. en dos granjas porcinas de Cundinamarca. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Perez, J., Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* Identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*, 10 (325), 1-11.
- Perolat, P., Chappel, R., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D., Billingham, M., Letocart, M., Merien, F., Serrano, M. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 851-858.
- Petrakovsky, J., Bianchi, A., Fisun, H., Nájera-Aguilar, P., Pereira, M. (2014). Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014), *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 10770-10789.
- Picardeau, M., Bulach, D., Bouchier, C., Zuerner, R., Zidane, N., Wilson, P., Creno, S., Kuczek, E., Bommezzadri, S., Davis, J., McGrath, A., Johnson, M., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R., Rood, J., Lajus, A., Davies, J., Médigue, C., Adler, B. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis, *PLoS ONE*, 3 (2), 1-9.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis, *Médecine et maladies infectieuses*, 43, 1-9.
- Poleo, C., Rodríguez, L., Garbi, J. (2006). Métodos alternativos para el control de ratas en el cultivo arroz. *Revista Digital CENIAP HOY*, 11, mayo-agosto 2006.

- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. (2004). Pre-PCR Processing. Strategies to Generate PCR-Compatible Samples, *Molecular Biotechnology*, 26, 133-146.
- Rivera, P., Ticlla, M., Balda, L., González, D., Céspedes, M. (2012). Diversidad genética de aislamientos peruanos de *Leptospira spp.* mediante electroforesis en gel de campo pulsado, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29 (4), 470-76.
- Roca, B. (2006). Leptospirosis, *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50 (2), 3-6.
- Romero, E., Blanco, R., Galloway, R. (2009). Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil, *Letters in Applied Microbiology*, 48, 623-627.
- Romero, M., Sánchez, J., González, L. (2011). Revisión sobre la importancia de la fauna silvestre en la epidemiología de la leptospirosis, *Biosalud*, 10 (2), 112-122.
- Romero-Vivas, C., Cuello-Pérez, M., Agudelo-Flórez, P., Thiry, D., Levett, P. y Falconar, A. (2013a). Cross-Sectional Study of *Leptospira* Seroprevalence in Humans, Rats, Mice, and Dogs in a Main Tropical Sea-Port City, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88 (1), 178-183.
- Romero-Vivas, C., Thiry, D., Rodríguez, V., Calderón, A., Arrieta, G., Máttar, S., Cuello, M., Levett, P. y Falconar, A. (2013b). Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia, *Biomédica*, 33 (Supl.1), 179-84.
- Roqueplo, C., Cabre, O., Davoust, B., Kodjo, A. (2013). Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia, *Veterinary Medicine International*, Volumen 2013, 1-6.
- Saito, M., Villanueva, S., Kawamura, Y., Lida, K., Tomida, J., Kanemaru, T., Kohno, E., Miyahara, S., Umeda, A., Amako, K., Gloriani, N., Yoshida, S. (2013). *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2457-2462.
- Sadow, K., Ramírez, W. (2005). Leptospirosis, *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 6 (6), 1-61.
- Salaun, L., Mérien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M. (2006). Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (11), 3954-3962.
- Schneider, M., Jancloes, M., Buss, D., Aldighieri, S., Bertherat, E., Najera, P., Galan, D., Durski, K., Espinal, M. (2013). Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 7229-7234.
- Schreier, S., Dounghawee, G., Chadsuthi, S., Triampo, D., Triampo, W. (2013). Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests, *Expert Review of Clinical Immunology*, 9 (3), 263-280.
- Shimabukuro, F., Domingues, P., Langoni, H., Silva, A., Pinheiro, J., Padovani, C. (2003). Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de

- rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40, 243-253.
- Suepaul, S., Carrington, C., Campbell, M., Borde, G., Adesiyun, A. (2011). Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad, *Tropical Animal Health and Production*, 43 (2), 367-75.
- Tesic, M., Zugic, G., Kljajic, R., Blagojevic, M. (2003). Leptospirosis on a pig farm: health and economic significance and creation of eradication program, *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 1-3.
- Verdasquera, D., Ortega, L., Fernández, C., Obregón, A., Rodríguez, I., Miyar, R. (2011). Enfrentamiento a brotes epidémicos de leptospirosis humana, *Revista Panamericana de Infectología*, 13 (1), 28-35.
- Villanueva, S., Saito, M., Baterna, R., Estrada, C., Rivera, A., Dato, M., Zamora, P., Segawa, T., Cavinta, L., Fukui, T., Masuzawa, T., Yanagihar, Y., Gloriani, N., Yoshida, S. (2014). Leptospira-rat-human relationship in Luzon, Philippines, *Microbes and Infection*, 16, 902-910.
- Wynwood, S., Graham, G., Weier, S., Collet, T., McKay, D., Craig, S. (2014). Leptospirosis from water sources, *Pathogens and Global Health*, 108 (7), 334-338.
- Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being, *Preventive Veterinary Medicine*, 101, 148-156.

9. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Consentimiento Informado Toma y Uso de Muestras Biológicas en Animales
Domésticos

Yo, _____ identificado (a) con cédula de ciudadanía No. _____ de _____, autorizo la utilización de los animales de la finca _____, localizada en el municipio de _____, departamento de _____ con el fin de que sean tomadas muestras de sangre por venopunción y orina por micción espontánea de porcinos, la captura y toma de muestras de sangre y riñón de roedores, y de muestras de agua. Además, acepto contestar las preguntas que me formulen respecto a lo que he observado en mis animales e igualmente autorizo la toma de fotos en mi finca, para la participación en el proyecto “ESTUDIO EXPLORATORIO DE *Leptospira* spp. EN PORCINOS, ROEDORES Y AGUA EN EL CICLO PRODUCTIVO DE UNA GRANJA EN PUERTO LÓPEZ, META, COLOMBIA” de la estudiante Maria Catalina Ospina Pinto de la Universidad de La Salle.

Objetivo del estudio

El propósito de este estudio es realizar un estudio exploratorio de *Leptospira*

spp. mediante métodos diagnósticos convencionales y moleculares en porcinos, roedores sinantrópicos y agua en el ciclo productivo de una granja en Puerto López, Meta, Colombia.

Metodología empleada

En el estudio se contemplan la toma de las siguientes muestras biológicas:

Sangre: De cada porcino se obtendrán 5 mL de muestra de sangre por venopunción de la vena auricular o yugular y por punción cardiaca en roedores, para separar el suero el cual se congelará a -20°C hasta la realización de la prueba de MAT (aglutinación microscópica) para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp.

Orina: De cada animal se recolectarán 10 mL de orina por micción espontánea, que se neutralizarán con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF). Las muestras se llevarán al laboratorio en el menor tiempo posible y serán utilizadas para realizar el cultivo microbiológico y PCR para la detección de la bacteria.

Riñón: Se extraerán los riñones de los roedores de forma aséptica para su posterior maceración en un mortero estéril con solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) y con este macerado se realizará el cultivo microbiológico y PCR.

Agua: Se tomarán muestras de agua de diferentes como tanques de almacenamiento, mangueras y chupos, entre otras, y se realizará el mismo procedimiento llevado a cabo con las muestras de orina.

Riesgos para los cerdos

La toma de muestras de sangre y orina no representa ningún riesgo potencial para los porcinos ni afectará su comercialización, además estas muestras serán tomadas por un médico veterinario con experiencia en el buen manejo de estos animales.

Confidencialidad

Se informa que los resultados obtenidos de las diferentes pruebas llevados a cabo con las muestras pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen tanto a usted como a

su finca.

Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de las muestras serán archivados y formarán parte del proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Los métodos utilizados en investigación suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para Usted. Sin embargo, en el caso que esta investigación proporcione datos relacionados con el diagnóstico actual o en el pasado de Leptospirosis que pudieran ser relevantes, los resultados obtenidos de las muestras de los cerdos le serán comunicados, si así Usted lo estima oportuno. Igualmente, la participación en este estudio no le generará ningún gasto y no recibirá compensación económica. La participación en el proyecto es libre y voluntaria y aún después de aceptar participar se puede retirar del estudio o negarse a que se le tome la muestra a los animales.

Atentamente,

Firma Propietario