

**Caracterización molecular de *Leptospira* spp en muestras de aguas estancadas producto de inundación, asociadas a casos de leptospirosis humana en Montería-Córdoba.**

**Beatriz Elena Muñoz Rosario**



"VIGILADA MINEDUCACIÓN"

**Universidad de Córdoba  
Facultad Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología  
Montería - 2022**

**Caracterización molecular de *Leptospira* spp en muestras de aguas estancadas producto de inundación, asociadas a casos de leptospirosis humana en Montería-Córdoba.**

**Beatriz Elena Muñoz Rosario**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de  
Bacteriólogo (a)**

**Virginia Consuelo Rodríguez Rodríguez  
Director (a)**

**Universidad de Córdoba  
Facultad Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología  
Montería - 2022**

## **Caracterización molecular de *Leptospira* spp en muestras de aguas estancadas producto de inundación, asociadas a casos de leptospirosis humana en Montería-Córdoba.**

Beatriz Muñoz Rosario <sup>1</sup>, Virginia Rodríguez Rodríguez <sup>2</sup>

1. Estudiante Bacteriología, Universidad de Córdoba, Facultad Ciencias de la Salud/Programa de Bacteriología, Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba/Semillero de Investigación EPIMOL, Montería, Colombia, bmunozrosario62@correo.unicordoba.edu.co

2. MSc, Universidad de Córdoba, Facultad Ciencias de la Salud/Programa de Bacteriología, Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, vrodriguez@correo.unicordoba.edu.co

### **RESUMEN**

**Objetivo.** Caracterizar molecularmente aislamientos de *Leptospira* spp en muestras de aguas estancadas producto de inundación en épocas de alta precipitación, asociadas a casos de leptospirosis humana en Montería-Córdoba. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio de tipo descriptivo prospectivo de corte transversal con el objetivo de caracterizar aislamientos de *Leptospira* spp en muestras de agua estancadas producto de inundación en épocas de alta precipitación, asociadas a casos confirmados de leptospirosis humana en el municipio de Montería-Córdoba. Por medio de un muestreo no probabilístico se seleccionaron zonas geográficas donde confluyen aguas producto de precipitaciones en áreas peridomiciliarias, las muestras de agua fueron cultivadas en medio EMJH. Los aislamientos sospechosos fueron confirmados para *Leptospira* spp por PCR y se caracterizó a nivel de genomoespacio, serogrupo y serovar utilizando MLST. **Resultados.** De los diez puntos geográficos muestreados, en cuatro se aisló *Leptospira* spp, dos de los aislamientos correspondieron a especies patógenas, *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar Pomona y *Leptospira interrogans* serogrupo Grippotyphosa serovar Grippotyphosa. **Conclusión.** El estudio permitió establecer el vínculo de transmisión de especies patógenas de *Leptospira* presentes en aguas estancadas y su asociación con

casos confirmados de la enfermedad. Estos hallazgos contribuyen al direccionamiento de estrategias de prevención y control de esta enfermedad y aportan al enfoque de “Una Salud” al determinar las genomoespecies circulantes y su vínculo en la transmisión de la leptospirosis humana en el contexto de la interfaz salud humana, animal y las condiciones del entorno.

**PALABRAS CLAVE.** Factor de riesgo, inundaciones, *Leptospira*, salud pública, zoonosis.

## Tabla de contenido

1. Introducción.....	5
2. Objetivos .....	7
2.1. Objetivo general .....	7
2.2. Objetivos específicos .....	7
3. Materiales y métodos .....	8
3.1. Tipo de estudio .....	8
3.2. Población .....	8
3.3. Lugar .....	8
3.4. Tipo de muestreo y selección de la muestra .....	8
3.5. Sitios de muestreos .....	8
3.6. Recolección de información sociodemográfica y clínica de los casos asociados a contacto con fuentes de agua estancada .....	9
3.7. Detección de <i>Leptospira</i> spp en muestras de agua estancadas producto de inundación durante épocas de alta precipitación en el municipio de Montería Córdoba .....	10
3.8. Identificación a nivel de genomoespecie de <i>Leptospira</i> spp en muestras de agua estancadas producto de inundación durante épocas de alta precipitación en el municipio de Montería-Córdoba.....	10
3.9. Análisis de datos.....	11
3.10. Consideraciones éticas .....	11
4. Resultados.....	11
5. Discusión .....	14
6. Conclusión .....	17
7. Referencias bibliográficas .....	17
8. Material gráfico .....	22

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis humana es causada por especies patógenas del género *Leptospira* spp. (1), las cuales se mantienen en los túbulos proximales de los riñones de animales infectados; crónicamente en los reservorios o temporalmente durante la infección aguda de animales susceptibles. Se excretan en la orina con la cual se contamina el suelo, aguas superficiales, arroyos y ríos. Los humanos se infectan por contacto directo con la orina o tejidos de animales infectados, e indirectamente a través de un ambiente contaminado, particularmente si hay abrasión o cortes en la piel (2). Es una zoonosis desatendida de alta incidencia en regiones, tanto tropicales como subtropicales, que presentan características sociales y ambientales entre las que se cuentan, pobreza, falta de agua potable y saneamiento, malas condiciones de vivienda, alta pluviosidad e inundaciones, todas, características comunes en zonas endémicas donde se favorece el mantenimiento en el ambiente de las especies patógenas de *Leptospira* como potencial factor de riesgo de infección para los hospederos susceptibles (2).

La incidencia anual de casos de leptospirosis por 100,000 habitantes varía entre 0,1 a 1 en climas templados, de 10 a 100 en los trópicos húmedos, a más de 100 casos en grupos de alto riesgo y durante brotes. Los casos de leptospirosis se presentan en todos los continentes, excepto en la Antártida (3) lo que ha permitido estimar que anualmente en promedio se presentan 1,03 millones de casos y 58.900 muertes (4). África reporta la incidencia media anual más alta (95,5/100.000 habitantes), seguida del Pacífico Occidental (66,4/100.000 habitantes), América (12,5/100.000 habitantes), Asia sudoriental (4,8/100.000 habitantes) y Europa (0,5/100.000 habitantes) (5), con tasas de letalidad, en algunas regiones, que oscilan entre el 20% y el 25% (6).

En Colombia, el evento se notifica al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) de forma obligatoria desde el año 2007. Para el año 2021 se confirmaron 494 casos, el mayor número de casos lo aportó Antioquia (93 casos), seguido de Buenaventura (47 casos) y Cauca (40 casos); la incidencia nacional fue de 0,99 casos por 100.000 habitantes. El departamento de Córdoba registró una incidencia de 1,14 por cada 100.000 habitantes, con veintiún casos confirmados en 2021, superando la incidencia media nacional (SIVIGILA INS, 2021). Hasta el periodo epidemiológico X de 2022 se han confirmado 126 casos de Leptospirosis en Colombia. Córdoba ha notificado 72 casos sospechosos, los cuales no han sido confirmados por laboratorio (SIVIGILA INS, 2022).

La ecología de la leptospirosis humana implica una interacción compleja entre el microorganismo, los reservorios animales y el ambiente. Se asocia con la superpoblación, saneamiento deficiente y sistemas de salud inadecuados en las zonas urbanas de los países en desarrollo, en los países desarrollados, donde las infecciones están aumentando actualmente, se asocia con actividades recreativas al aire libre. En áreas rurales, la transmisión está asociada con cultivos y actividades ganaderas, y el riesgo de transmisión aumenta durante los períodos cálidos y lluviosos (7).

La incidencia es estacional, alcanzando su punto máximo en verano y en otoño en climas templados y durante la estación lluviosa en áreas tropicales, reflejando la capacidad de la *Leptospira* para sobrevivir en ambientes externos. El suelo, el lodo y las aguas superficiales (8; 9) contaminadas con orina de hospederos infectados crónicamente, son importantes en la transmisión de la leptospirosis.

La inmersión prolongada, exponerse a agua contaminada o exposición durante actividades recreativas relacionadas con el agua se han relacionado a infecciones. Reportes de casos de leptospirosis asociados a inundaciones se han descrito en Filipinas, después de un tifón ocurrido el 26 de septiembre de 2009, se produjo un brote de leptospirosis en Metro Manila, donde 471 pacientes fueron hospitalizados y 51 (10,8%) murieron, la mayoría de los aislamientos fueron positivos para *L. borgpetersenii* serovar Tarassovi, seguido de serovares Poi y Sejroe y *L. interrogans* serovares Losbanos y Manilae (10); en Nueva Caledonia, un archipiélago que hace parte de la subregión de Melanesia, bajo la influencia del fenómeno de La Niña, las altas precipitaciones se asociaron con inundaciones y una epidemia de leptospirosis humana durante el primer semestre de 2008, esta epidemia afectó al menos a 135 personas y tuvo una distribución rural (11); el 15 de enero de 2005 en Guyana, 10 pulgadas de lluvia cayeron en 15 horas, lo que provocó extensas inundaciones a lo largo de la costa atlántica densamente poblada donde reside la mayor parte de la población. Más de 300.000 de los 750.000 habitantes de Guyana se vieron afectados, y se estima que 70.000 fueron desplazados. Los serovares más aislados fueron Icterohaemorrhagiae, Mankarso, Georgia, Bratislava, Autumnalis y Cynopteri (12); en la provincia de Linares - Chile, en diciembre de 2001, 182 niños realizaron un baño recreacional en una piscina de una escuela rural y días después empezaron a presentar síntomas compatibles con la enfermedad (13).

El conocimiento sobre la abundancia y distribución de *Leptospira* patógena en aguas superficiales que sirven como fuente de transmisión en áreas endémicas es limitado. Los factores ambientales que influyen en su abundancia, distribución y por lo tanto en el riesgo de infección, son poco conocidos. La leptospirosis ha surgido recientemente como un importante problema de salud pública entre los asentamientos urbanos empobrecidos en los países en desarrollos tropicales y subtropicales. El saneamiento inadecuado en estos entornos, específicamente los sistemas de alcantarillado precarios y la acumulación de basura, promueve la prosperidad de los roedores, que son los principales reservorios de *Leptospira* patógena (14).

Desde el punto de vista de salud pública la determinación de *Leptospiras* a partir de muestras de aguas estancadas producto de inundación en épocas de alta precipitación en áreas peridomiciliares donde circulan personas para acceder a sus viviendas, lugares de trabajo o estudio constituye un aspecto prioritario que merece ser tenido en cuenta en la formulación de estrategias de prevención y control por parte de las autoridades sanitarias del orden local y departamental. Un determinado serovar puede desarrollar una relación comensal o de leve patogenicidad con determinada especie animal (15), y como es bien sabido en las áreas peridomiciliarias circulan no solo personas sino animales de compañía que pueden comportarse como diseminadores de la bacteria , ya que estos son hospederos primarios esenciales para la persistencia de focos de infección, mientras que los seres humanos son hospederos accidentales poco eficientes en la perpetuación de la enfermedad en el ambiente.

El agua es un vehículo importante de transmisión de la enfermedad, es por esto que se propone la búsqueda de *Leptospira* spp en aguas producto de inundaciones durante épocas de alta precipitación en la ciudad de Montería - Córdoba de tal forma que se puedan establecer las genomoespecies circulantes y su posible vínculo en la transmisión en la leptospirosis humana.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar molecularmente aislamientos de *Leptospira* spp en muestras de agua estancadas producto de inundaciones en épocas de alta precipitación, asociadas a casos de leptospirosis humana en Montería-Córdoba

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer fuentes de contaminación ambiental (aguas estancadas) asociadas a casos confirmados de leptospirosis humana en la ciudad de Montería-Córdoba.

- Identificar *Leptospira* spp en muestras de agua estancada producto de inundaciones asociadas a casos de leptospirosis humana en el municipio de Montería-Córdoba.
- Evaluar la variabilidad genética de aislados de *Leptospira* spp obtenidos a partir de muestras de aguas estancadas producto de inundaciones asociadas a casos de leptospirosis humana en el municipio de Montería-Córdoba.

## **MATERIALES Y METODOS**

**Tipo de estudio:** Descriptivo- prospectivo de corte transversal

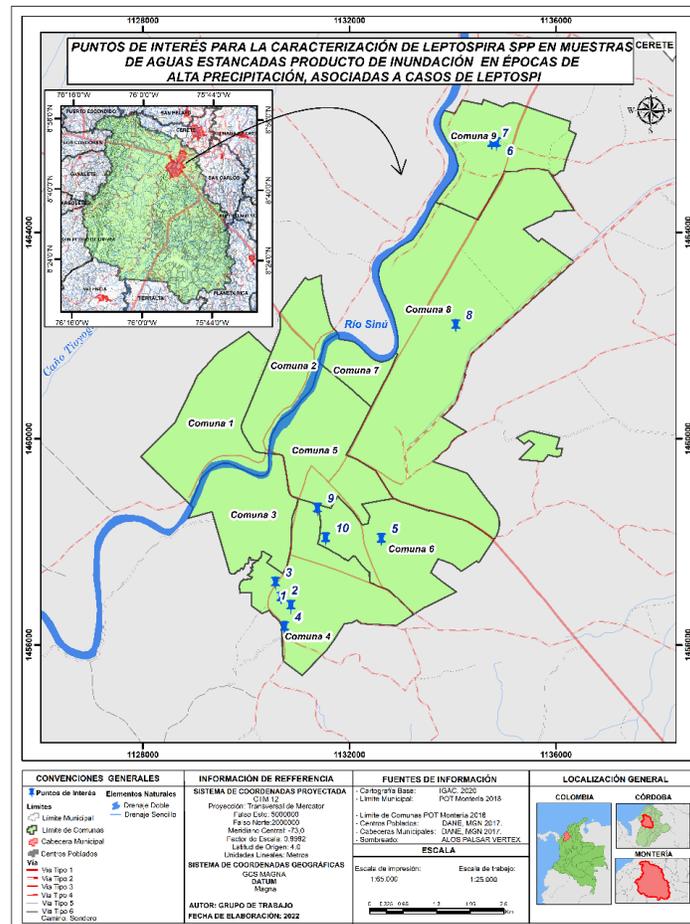
**Población:** Aguas estancadas producto de altas precipitaciones en áreas peridomiciliarias de la ciudad de Montería.

**Lugar:** Municipio de Montería (8° 44' 52.73 N, 75° 52' 53.15 O), perteneciente al departamento de Córdoba ubicado en el noroccidente de Colombia. El clima de la ciudad de Montería es cálido tropical con una estación de sequía y una de lluvias a lo largo del año. La temperatura promedio anual de la ciudad es de 32 °C con picos de hasta 45 °C. Se divide en zona rural y urbana de la siguiente manera: la primera conformada por 28 corregimientos y la segunda, que está dividida en 207 barrios distribuidos en nueve comunas.

**Tipo de muestreo y selección de la muestra.** Se realizó un muestreo no probabilístico, a partir del cual se identificaron puntos de muestreo en la ciudad de Montería -Córdoba donde confluyen aguas producto de precipitaciones en áreas peridomiciliarias asociados a casos confirmados de leptospirosis humana. Una vez caracterizados estos casos epidemiológicamente; se evidenció que residían en sitios que permanecían anegados, y la población se veía obligada a pasar por estos para acceder a sus hogares, sitios de trabajo o estudio.

**Sitios de muestreo.** Los sitios de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados del proyecto “Caracterización Epidemiológica de la Leptospirosis Humana en el departamento de Córdoba – Colombia”, el cual confirmó 33 casos de leptospirosis humana en el municipio de Montería. A los pacientes confirmados se les realizó visita de campo y a partir de la encuesta de riesgo se estableció como posible fuente de contagio el haber circulado por lugares inundados para desplazarse a sus hogares, sitios de trabajo y estudio. Un total de cinco pacientes refirieron haber estado expuestos a aguas estancadas producto

de inundación, dos de ellos relacionaron el mismo sitio y dos reportaron haber estado en contacto con aguas de dos lugares diferentes. La ubicación de las coordenadas se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Puntos de muestreo de aguas estancadas producto de inundaciones, asociadas a casos de leptospirosis humana. Punto 1. 8.724340, -75.888344; Punto 2. 8.725757, -75.890060; Punto 3. 8.728405, -75.891053; Punto 4. 8.720590, -75.889465; Punto 5. 8.736004, -75.872383; Punto 6. 8.805332, -75.851860; Punto 7. 8.805304, -75.852714; Punto 8. 8.773419, -75.859172; Punto 9. 8.741363, -75.883629; Punto 10. 8.736155, -75.882179.

**Recolección de información sociodemográfica y clínica de los casos asociados a contacto con fuentes de agua estancada.** Los datos fueron consultados en la base de datos del proyecto “Caracterización Epidemiológica de la Leptospiriosis Humana en el departamento de Córdoba – Colombia”.

**Detección de *Leptospira* spp en muestras de agua estancadas producto de inundación durante épocas de alta precipitación en el municipio de Montería Córdoba.** La toma de muestra de agua se realizó dentro de los ocho a quince días de confirmado el diagnóstico de leptospirosis humana, previa visita de campo para identificar el sitio como posible fuente de contagio. Por cada sitio de muestreo se seleccionaron dos puntos para toma de muestra de agua, prefiriéndose las áreas sombreadas (protegido de los rayos solares), con pH superior a 7.0, frecuentado por animales o presencia de roedores y cercanía a sitios de disposición de basuras. Una vez seleccionado el punto de muestreo, para la toma de muestra de agua se sumergió un frasco estéril aproximadamente 20-30 cm y se tomó un volumen de 50mL. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de investigación del grupo GIMBIC a temperatura ambiente.

Las muestras de agua (50mL) fueron filtradas con filtro Whatman N°1, 20 mL del filtrado se pasaron por membrana de 0,2 µm y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm, durante 30 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 2 mL de PBS pH 7,2, se tomaron 0,5 mL de la suspensión y se inocularon en medio EMJH líquido y semisólido enriquecido con 1% de suero de conejo. Los cultivos fueron incubados entre 29°C-30°C y se realizó seguimiento semanal durante cuatro meses. El restante de la muestra de agua, se concentró a 14000 rpm por 10 minutos y el pellet obtenido fue utilizado para extracción de ADN utilizando el kit DNA QIAamp Qiagen, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Para la implementación de la PCR se usaron los iniciadores propuestos por Fearnley, C et al (2008) (16), PFA Forward: 5´ TGA GTA ACA CGT GGG TAA TCT TCC 3´, PRA Reverse: 5´ AGG TAC CAT CAT CAC ATYG CTGC 3´ (4), que flanquean un fragmento de 347pb del gen rrs16S RNAr. Las condiciones de la mezcla de reacción y ciclos térmicos fueron ajustadas de acuerdo con lo propuesto por Fearnley, C et al (2008) (16).

**Identificación a nivel de genomoespecie de *Leptospira* spp en muestras de agua estancadas producto de inundación durante épocas de alta precipitación en el municipio de Montería-Córdoba.**

En las muestras de agua donde se logró hacer aislamientos y se realizó extracción de ADN a partir de 5mL de cultivo con 7 días de crecimiento. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNA QIAamp Qiagen, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se implementó PCR para el gen 16S RNAr de acuerdo a lo anteriormente descrito.

Se implementó tipificación de secuencias de multilocus MLST utilizando el esquema propuesto por Ahmed et al (2006) (17) para seis loci: adK, icdA, lipL32, lipL41, rrS2 y secY. Los iniciadores, condiciones de la mezcla de reacción y ciclos térmicos de las PCR implementadas fueron los descritos por Ahmed et al (2006) (17).

**Análisis de datos.** Los productos de amplificación del gen 16S RNAr obtenidos de los cultivos positivos y los productos de amplificación de los loci adK, icdA, lipL32, lipL41, rrS2 y secY fueron secuenciados por el método de Sanger en MacroGen Korea. Para el análisis del gen 16S rRNA se utilizaron secuencias de las genomoespecies del género *Leptospira* pertenecientes a los subclados P1, P2, S1 y S2. Todas las secuencias fueron alineadas con ClustalW, el modelo de sustitución fue Kimura 2 parámetros con 1000 bootstrap y la reconstrucción filogenética fue realizada con el método de Neighbor-Joining (NJ). Todos los procedimientos se realizaron con el Software MEGA X.

Las secuencias depuradas de los loci adK, icdA, lipL32, lipL41, rrS2 y secY, se utilizaron para determinar la secuencia tipo ST utilizando la plataforma disponible PubMLST.

Se utilizó la hoja de cálculo de Excel para realizar un análisis descriptivo de la información.

**Consideraciones éticas.** El estudio se rigió por las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de Salud de Colombia (Resolución N° 008430 del 4 de octubre de 1993) y la declaración de Helsinki refrendada en 2013. El estudio fue catalogado según la resolución como: “Investigación con riesgo inferior al mínimo.

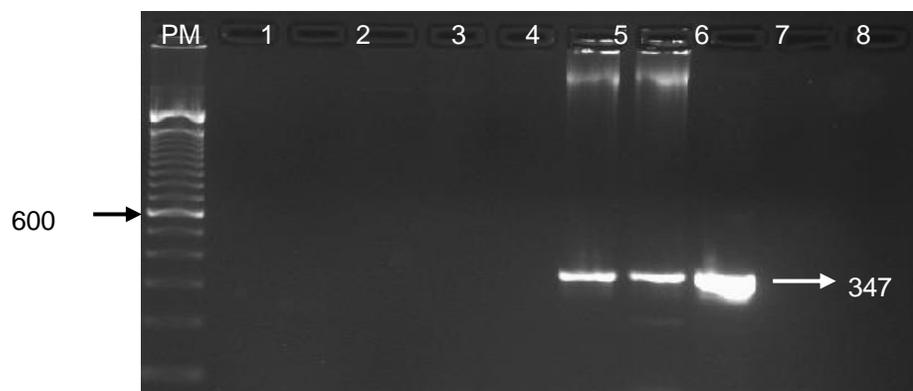
## RESULTADOS

El estudio “Caracterización Epidemiológica de la Leptospirosis Humana en el departamento de Córdoba – Colombia” durante el periodo 2017-2021 confirmó en la ciudad de Montería 33 casos de leptospirosis aguda, con un caso fatal (mortal). El 69,7% (n=23) de los casos fueron de sexo masculino y el 30,3% (n=10) femenino. Predominó el grupo etario de 15-25 años (30,3%; n=10) y la ocupación más frecuente fue trabajo informal (36,4%; n=12), seguido de estudiantes (33,3%; n=11). En relación con la tenencia de animal de compañía, catorce manifestaron tener perro; cinco simultáneamente perro y gato y uno gato. La

presencia de ratas al interior de la vivienda fue reportada en 25 casos y alrededor del domicilio en 19 casos.

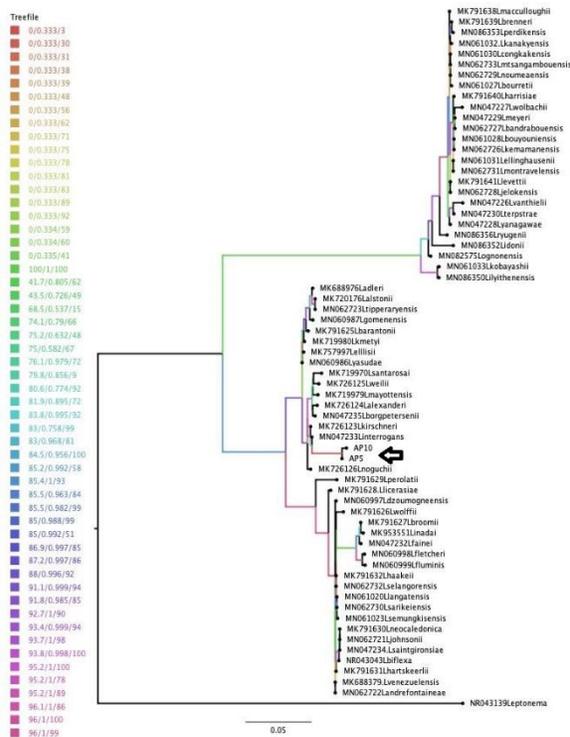
De los 33 pacientes confirmados como positivos, cinco refirieron haber estado expuestos a aguas estancadas producto de inundación, dos de ellos relacionaron el mismo sitio y dos reportaron haber estado en contacto con aguas de dos lugares diferentes. De los diez puntos geográficos muestreados, en cuatro se aisló *Leptospira* spp, dos de los aislamientos correspondieron a especies patógenas y dos a especies saprofitas, los cuales fueron confirmados por PCR para el gen 16SRNA (Figura 2).

Para los sitios geográficos (Punto 5 y Punto 10), se consultaron los datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes que los refirieron. En el caso del Punto 10 el paciente asociado correspondió a un individuo de sexo masculino de 41 años que realiza trabajos informales y consultó por fiebre, mialgia y cefalea; se confirmó el diagnóstico por prueba de Microaglutinación MAT por seroconversión al serogrupo Sejroe con un título de 1:3200. El Punto 5 de muestreo fue referenciado por dos pacientes de sexo masculino con edades de 33 y 46 años; el primero consultó por fiebre, mialgia, cefalea, artralgia y eyección conjuntival; el segundo por fiebre, mialgia, cefalea; en ambos casos el diagnóstico se hizo por PCR en sangre y se asoció la genomoespecie *Leptospira interrogans* como causante.



**Figura 2.** Resultados de la PCR para el gen 16S RNAr de los aislamientos a partir de muestras de agua estancada. PM patrón de peso molecular 100pb invitrogen. Carriles 1, 2, 3, 4, 5 muestras negativos para *Leptospiras* patógenas, carriles 6 y 7 muestras positivas para *Leptospiras* patógenas, carril 8 control positivo ADN *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni, carril 9 control de reactivos.

Los resultados del análisis de las secuencias de los productos de amplificación del fragmento de 347pb de bases del gen *16S RNAr* para los aislamientos patógenos a partir de las muestras de agua mostró que la genomoespecie involucrada es *Leptospira interrogans*. La reconstrucción filogenética a partir de la secuencia parcial del gen 16S RNAr se presenta en la figura 3.



**Figura 3.** Análisis filogenético de aislamientos de *Leptospira* spp basado en la secuencia del gen 16s RNA por el método de Neighbor-Joining. Aislamientos puntos AP5 y AP10.

Para llegar a la clasificación de especie, serogrupo y serovar se implementó la técnica de MLST. En la tabla 1, se relacionan los resultados del esquema implementado de MLST para los dos aislamientos patógenos obtenidos a partir de muestras de aguas estancadas.

**Tabla 1.** Resultados del esquema tres de MLST aplicado a los aislamientos patógenos obtenidos a partir de agua estancada procedente de Montería – Córdoba, Colombia.

Tipo de muestra	Alelos						Secuencia Tipo ST	Especie/Serogrupo/serovar
	<i>adK</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrS2</i>	<i>secY</i>		

<b>Aislamiento de agua 1</b>	2	2	3	9	2	6	58	Leptospira interrogans / Pomona / Pomona
<b>Aislamiento de agua 2</b>	5	2	2	8	1	3	74	Leptospira interrogans / Grippotyphosa / Grippotyphosa

## DISCUSIÓN

La leptospirosis, además de ser una enfermedad endémica en los sistemas de producción agropecuaria, ha surgido como un problema generalizado en las poblaciones de barrios marginales urbanos donde el saneamiento inadecuado ha producido condiciones para la transmisión de la enfermedad (18). En entornos urbanos, grandes cantidades de agua de inundación con frecuencia desbordan los sistemas de alcantarillado, lo que aumenta el riesgo de infección a través del contacto directo con agua contaminada o al facilitar la dispersión a suelos que pueden ser preparados por la lluvia para volverse cada vez más adecuados para la supervivencia y persistencia de patógenos (19).

En el estudio técnico para el Plan de Ordenamiento Territorial del Municipio de Montería, se definieron tres categorías para la amenaza por inundación: alta, moderada y baja. La amenaza alta corresponde aproximadamente a un 30% del territorio, las zonas de amenaza moderada, correspondiente al 32,7% de la superficie urbana; se localizan al nororiente de Montería, y aunque corresponden a cuencas inundables, no presentan inundaciones tan frecuentes como las zonas de amenaza alta. Las zonas de baja amenaza ocupan el restante 36.4% del área urbana y se ubican adyacentes a las dos categorías previamente descritas. Los dos puntos de muestreo donde se confirmó el aislamiento de *Leptospira spp* en muestras de agua estancada producto de inundación se ubican en barrios (Edmundo López y La Pradera) que presentan amenaza alta de acuerdo con el Plan de Ordenamiento Territorial.

Leptospiras saprofitas y patógenas se han aislado de fuentes ambientales, ya que son capaces de sobrevivir en suelo húmedo y agua dulce durante varias semanas. La capacidad de *Leptospira* para ocupar varios nichos ecológicos se debe sin duda a una diversidad de mecanismos, como los sistemas de transducción de señales, codificados por su gran genoma y que le permiten adaptarse y resistir condiciones estresantes (20).

Los aislamientos de *Leptospiras* patógenas corresponden a la especie *L. interrogans*. La presencia de *L. interrogans* y su vínculo de transmisión a humanos se demostró con la asociación de esta especie como la causal de la enfermedad en dos de los pacientes que refirieron contacto con estas aguas estancadas. Se reconoce que la persistencia ambiental de las cepas patógenas de *Leptospira* varía entre las especies. Se ha demostrado para especies como *L. interrogans* que es capaz de sobrevivir y retener la virulencia en el agua hasta por 344 días, su capacidad para sobrevivir en el medio ambiente es consistente con el hallazgo de que su genoma contiene múltiples genes que codifican proteínas de transducción de señales y una mayor cantidad de genes que se regulan diferencialmente cuando se expone a temperaturas ambientales y diferentes condiciones de osmolalidad (21, 22); igualmente se ha demostrado la sobreexpresión de la proteína GroEL que permite la formación de biopelículas (23; 24). Todas estas características genéticas podrían desempeñar un papel importante para facilitar la transición de este patógeno entre los mamíferos huéspedes, el suelo y el agua; y tener un papel importante en su persistencia en el medio ambiente después de su eliminación en la orina animal (25).

Los dos casos confirmados de leptospirosis que referenciaron en común uno de los puntos de muestreo, registraron en la encuesta epidemiológica que era una zona de paso obligatorio para acceder a sus lugares de trabajo. De acuerdo a los lineamientos de vigilancia y control del evento leptospirosis del Instituto Nacional de Salud (SIVIGILA) dentro de las acciones de vigilancia en salud pública por parte de las autoridades sanitarias del orden departamental y local es necesaria la investigación epidemiológica de los casos con el fin de direccionar las acciones adecuadas de prevención y control. La determinación de la genomoespecie *Leptospira interrogans* suscita el interés de promover acciones de prevención primaria en las comunidades aledañas al punto de muestreo, de tal forma que puedan conocer que dicha zona además de ser catalogada como de amenaza alta por parte del POT de Montería, se podría considerar un factor de riesgo para la presentación de leptospirosis en humanos que usualmente la transitan en épocas de alta precipitación sin utilizar métodos de barrera que protejan piel y mucosas.

El Punto de muestreo 5 cuenta con espacios resguardados de la luz, donde la bacteria obtiene todos los requisitos que necesita para mantenerse y esparcirse. La principal vía de contagio de la leptospirosis comienza a partir de la orina de un animal infectado, que puede

ser doméstico o no. Los caninos de las áreas residenciales cercanas pueden utilizar el agua estancada como fuente de consumo o los roedores principales reservorios pueden diseminar la bacteria en áreas domiciliarias y peridomiciliarias, por lo cual se sugiere que los resultados de este estudio sean tenidos en cuenta no solo por parte del área de salud pública de la Secretaria de Salud Municipal sino por parte del área de Salud Ambiental del departamento de Córdoba, ya que el ciclo de transmisión de la enfermedad incluye a los animales reservorios que pueden comportarse como diseminadores de la bacteria, al ser estos hospederos primarios esenciales para la persistencia de focos de infección, mientras que los seres humanos son hospederos accidentales poco eficientes en la perpetuación de la enfermedad en el ambiente (16).

Desde esta perspectiva, se resalta la importancia del estudio bajo el enfoque de “Una Salud” al contribuir con la determinación de las genomoespecies circulantes y su posible vínculo en la transmisión de la leptospirosis humana en el contexto de la interfaz salud humana, animal y las condiciones del entorno; siendo una estrategia clave en la prevención y control de esta enfermedad de gran repercusión en salud pública.

*Leptospira interrogans* de los serogrupos Grippotyphosa y Pomona se pueden encontrar en muchos mamíferos como el ganado bovino, porcino, ovino, equino y roedores (1). Como estos animales suelen vivir muy cerca de los humanos, sus infecciones no solo desempeñan un papel económico, sino que también son importantes para la evaluación del riesgo de infección humana.

Los serogrupos Pomona y Grippothyphosa han sido reportados en diferentes estudios en Colombia. En el departamento de Antioquia en una población de 254 roedores (*Rattus norvegicus*) se encontró una seroprevalencia de leptospirosis del 25 % con la presencia del serogrupo Grippotyphosa en el 24 % de los animales positivos (26). En el municipio de Don Matias se estudiaron 23 granjas encontrándose por MAT prevalencias del 22,4 % en operarios, 60,9 % en vacas, 10,3 % en cerdos de ceba y 25,7 % en lechones, donde uno de los serogrupos más representativos fue Pomona (27). En los trabajadores de plantas de beneficio bovino de los municipios de Sogamoso, Chiquinquirá, Paipa, Aquitania y Tuta en el departamento de Boyacá, se determinó una seroprevalencia del 35%; de las muestras positivas, el 2,78 % fue atribuible a los serogrupos Pomona y Grippotyphosa (28). En Córdoba muestras de 70 perros procedentes del municipio de Ciénaga de Oro, se encontró

una seroprevalencia del 47,14 % y los sergrupos Grippyphosa y Pomona se reportaron en el 37,14 %, y 25,71 % de los caninos respectivamente (29). En un estudio realizado en 2012 en Córdoba, se recolectaron muestras en 28 fincas del departamento con antecedentes de problemas reproductivos, se obtuvo una prevalencia del 41 % y dentro de los serogrupos más frecuentes estuvo Grippyphosa con el 29,85 % (30).

*L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Pomona se ha asociado a diferentes tipos de portadores, como caballos, cerdos, perros y otros animales. En Córdoba (Colombia), estudios previos en granjas porcícolas han reportado una prevalencia para *Leptospira* spp del 55.9 % en cerdos, con el aislamiento de *L. interrogans* serogrupo Pomona serovar Pomona en su orina y en aguas asociadas a estas explotaciones porcinas lo que implica posibles fuentes de contaminación ambiental (31, 32). De un total de 673.960 cerdos reportados por el censo pecuario (Informe de vacunación porcinos y predios) el 92.72% (n= 624.941) son sistemas extensivos y semi extensivos, sin manejo de esquemas de vacunación para leptospirosis, esto estaría favoreciendo la transmisión de la bacteria *Leptospira* al ambiente.

## CONCLUSIÓN

El estudio permitió establecer el vínculo de transmisión de especies patógenas de *Leptospira* presentes en aguas estancadas y su asociación con casos confirmados de la enfermedad. Estos hallazgos contribuyen al direccionamiento de estrategias de prevención y control de esta enfermedad y aportan al enfoque de “Una Salud” al determinar las genomoespecies circulantes y su vínculo en la transmisión de la leptospirosis humana en el contexto de la interfaz salud humana, animal y las condiciones del entorno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero-Vivas C., Falconar A. *Leptospira* spp. Y leptospirosis humana [Internet]. Salud uninorte. 2016. 32 (1): 123-143. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
2. Pereira MM, Schneider MC, Munoz-Zanzi C, Costa F, Benschop J, Hartskeerl R, et al. A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs

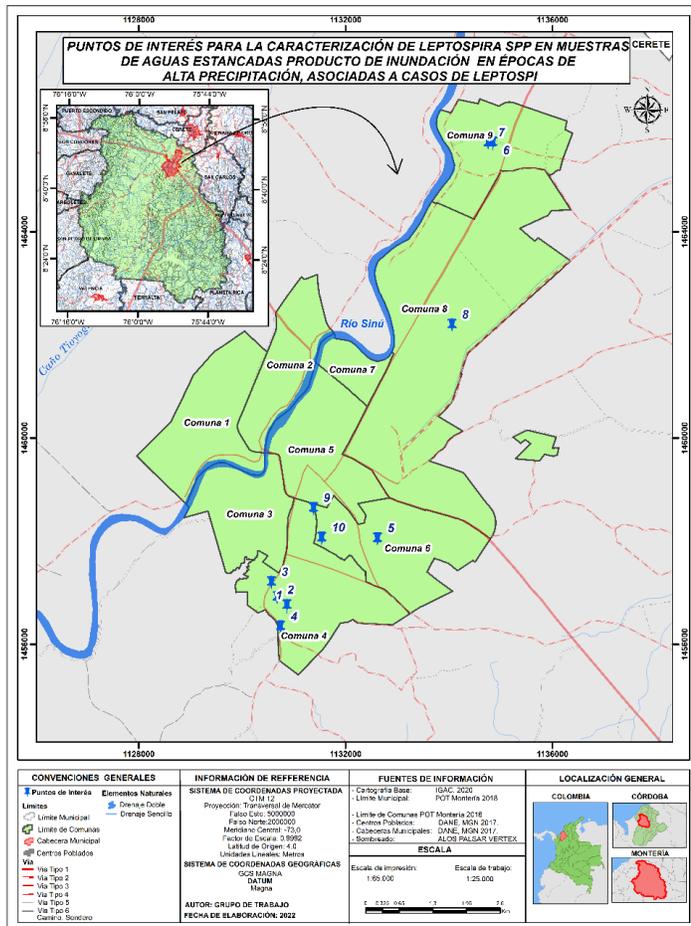
- in Latin America. *Rev Panam Salud Pública*. 2017; 41: e131. doi: 10.26633/RPSP.2017.131.)
3. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet Microbiol*. 2011; 153(1-2):73-81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.055>.
  4. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of Leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9): e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
  5. Mgone GF, Machang'u RS, Mhamphi GG, Katakweba A, Mulungu LS, Durnez L, et al. *Leptospira* serovars for diagnosis of leptospirosis in humans and animals in Africa: Common leptospira isolates and reservoir hosts. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015; 9(12). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>
  6. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326
  7. Gutiérrez JD, Martínez-Vega RA, Botello H, Ruiz-Herrera FJ, Arenas-López LC, Hernández-Tellez KD. Environmental and socioeconomic determinants of leptospirosis incidence in Colombia. *Cad Saude Publica*. 2019 Mar 25; 35(3):e00118417. doi: 10.1590/0102-311X00118417.
  8. Jason S. Lehmann, Michael A. Matthias, Joseph M. Vinetz and Derrick E. Fouts. Leptospiral Pathogenomics. *Pathogens*. 2014, 3: 280-308; doi: 10.3390/pathogens3020280.
  9. Monahan, A.M.; Miller, I.S.; Nally, J.E. Leptospirosis: risks during recreational activities. *J. Appl. Microbiol*. 2009, 107, 707–716.
  10. Amilasan AT, Ujije M, Suzuki M, Salva E, Belo MCP, et al. Outbreak of Leptospirosis after Flood, the Philippines, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 91-94. <https://doi.org/10.3201/eid1801.101892> PMID: 22257492.
  11. Goarant C, Laumond-Barney S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, et al. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of

- disease. *Trop Med Int Health*. 2009; 14: 926-929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02310.x> PMID: 19552660.
12. Dechet AM, Parsons M, Rambaran M, Mohamed-Rambaran P, Florendo-Cumbermack A, Persaud S, et al. Brote de leptospirosis después de inundaciones graves: una evaluación rápida y una campaña de profilaxis masiva; Guyana, enero-febrero de 2005. *PLoS Uno*. 2012; 7(7):e39672. doi: 10.1371/journal.pone.0039672.
  13. Arias P. Héctor, Núñez. M, Valenzuela .I, Olivares. A. Brote epidémico de leptospirosis en niños de Linares. *Rev. chil. pediatra* [Internet]. 2003; 74(4): 405-410. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062003000400008>.
  14. Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupe´-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*. 2020; 15(1): e0227055. <https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0227055>.
  15. Nájera Saholet, Alvis Nelson, Babilonia David, Alvarez Ligia, Máttar Salim. Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2005 Jun [citado 2022 Jul 26] ; 47( 3 ): 240-244. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342005000300008&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000300008&lng=es).
  16. Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, Woodward MJ. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Research in Veterinary Science* [Internet]. Agosto de 2008; 85(1):8-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.005>
  17. Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006 Nov 23; 5:28. doi: 10.1186/1476-0711-5-28. PMID: 17121682; PMCID: PMC1664579.
  18. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. Octubre de 2009; 7(10):736-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>

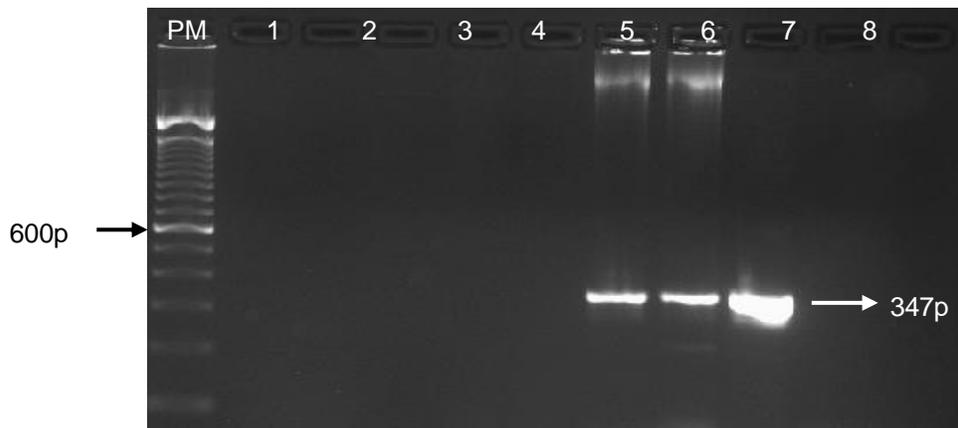
19. Barragan V, Olivas S, Keim P, Pearson T. Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]
20. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May 23; 13(5):e0007270. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270. PMID: 31120895; PMCID: PMC6532842.].
21. Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, Zuerner RL, Adler B. 2006. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun* **74**:5848–5859. doi: 10.1128/IAI.00755-06. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. 2007. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun* **75**:2864–2874. doi: 10.1128/IAI.01619-06. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Barragan VA, Mejia ME, Travez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA. 2011. Interactions of leptospira with environmental bacteria from surface water. *Curr Microbiol* 62:1802–1806. doi: 10.1007/s00284-011-9931-3,
24. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, Picardeau M. 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154:1309–1317. doi: 10.1099/mic.0.2007/014746-0
25. Barragan V, Olivas S, Keim P, Pearson T. Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet].

26. Agudelo P, Quiroz AF, Ángel VH, Moreno N, Loaiza LF, Rodas JD. Prevalence of *Leptospira* spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Vol: 81: 906-910.
27. Ochoa J, Sánchez A, Ruiz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2000; 7(5). 325-331.
28. Pedraza A, Salamanca E, Ramirez R, Ospina J, Pulido M. Seroprevalencia de anticuerpos anti-leptospira en trabajadores de plantas de sacrificio animal en Boyacá, Colombia. *Infectio*. 2012; 16(1): 31-36.
29. Álvarez L, Calderón A, Rodríguez V, Arrieta G. Seroprevalencia de leptospirosis canina en una comunidad rural del municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2011, 14 (2): 75 - 81.
30. Betancur H; Orrego A; González M. Seroepidemiology of leptospirosis in cattle with reproductive disorders from the Municipality of Montería, Colombia. *Rev. Med. Vet. (Bogotá)* 2013; 26:47-55.
31. Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Mattar S, Cuello M, Levett PN, Falconar AK. Caracterización molecular de serovariedades de *Leptospira* spp. aisladas de muestras de animales y agua en Colombia. *biomedica* [Internet]. 1 de agosto de 2013; 33(Sup1):179-84. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/731>,
32. Calderón A, Rodríguez V, Mattar S, Arrieta G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*. 2014; 46(2):427-432. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0508-y>

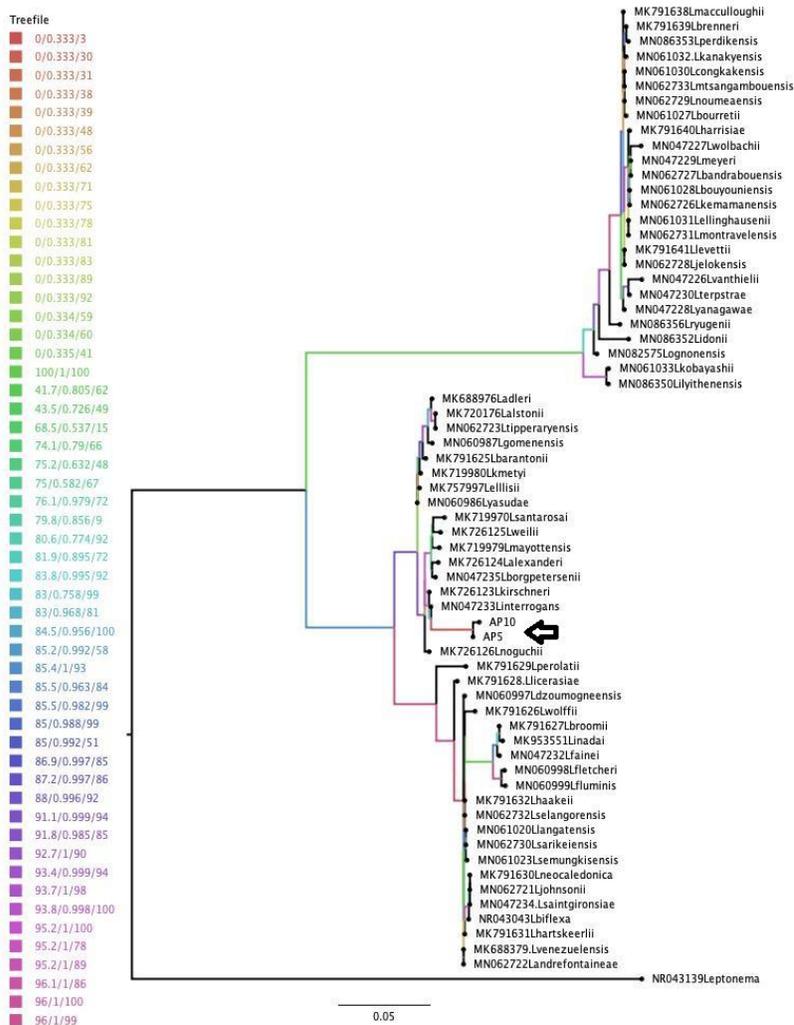
# MATERIAL GRÁFICO



**Figura 1.** Puntos de muestreo de aguas estancadas producto de inundaciones, asociadas a casos de leptospirosis humana.



**Figura 2.** Resultados de la PCR para el gen 16S RNAr de los aislamientos a partir de muestras de aguas estancadas. PM patrón de peso molecular 100pb invitrogen. Carriles 1, 2, 3, 4, 5 muestras negativos para *Leptospiras* patógenas, carriles 6 y 7 muestras positivas para *Leptospiras* patógenas, carril 8 control positivo ADN *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni, carril 9 control de reactivos.



**Figura 3.** Análisis filogenético de aislamientos de *Leptospira* spp basado en la secuencia del gen 16s RNA por el método de Neighbor-Joining. Aislamientos puntos AP5 y AP10.

Tabla 1. **Resultados del esquema tres de MLST aplicado a los aislamientos patógenos** obtenidos a partir de agua estancada. Montería, Córdoba. Colombia.

Tipo de muestra	Alelos						Secuencia	Especie/Serogrupo/serovar
	<i>adK</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL32</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrS2</i>	<i>secY</i>	Tipo ST	
Aislamiento de agua 1	2	2	3	9	2	6	58	<i>Leptospira interrogans</i> / Pomona / Pomona
Aislamiento de agua 2	5	2	2	8	1	3	74	<i>Leptospira interrogans</i> / Grippotyphosa / Grippotyphosa