Informe Final

Presencia de *Leptospira spp.* circulante en mustélidos, prociónidos y félidos silvestres del Centro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburrá, Colombia.

Gloria Elena Jaramillo

Víctor Manuel Vélez Bedoya

Díber Marcela Ramírez Monroy

Investigadores Principales

Piedad Agudelo Flórez

Janeth Pérez García

Asesoras

Juliana Jaramillo Cárdenas

Auxiliar de Investigación

Tabla de contenido

Resumen 3
Abstract 4
Introducción y estado del arte. 5
Objetivo general 9
Objetivos específicos .....
Materiales y Métodos .....
Aval del Comité de Ética para la experimentación animal .....
Tipo de Estudio *10*
Localización .....
Métodos *11*
Cultivo de cepas de referencia de Leptospira. .....
Obtención de muestras de sangre y orina. *12*
Procesamiento de las muestras de sangre. *13*
Procesamiento de las muestras de orina para el aislamiento de Leptospiras. .....
Evaluación de la respuesta serológica. *14*
Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). .....
Extracción del ADN genómico. *15*
Perfil térmico PCR múltiple. .....
Electroforesis. .....
Análisis Estadístico 16
Resultados .....
Determinación de la respuesta de anticuerpos por MAL. *18*
Discusión 20
Conclusiones 23
Agradecimientos 23
Referencias Bibliográficas 24

Resumen

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica bacteriana más ampliamente distribuida del planeta, causada por espiroquetas del genero *Leptospira*. Éstas espiroquetas han sido detectadas en casi todas las especies de mamíferos que han sido muestreadas y en todos los continentes del mundo excepto en la Antártida [1ï 3].
Su comprensión dista ampliamente de los avances y estudios de otras enfermedades de origen bacteriano [1].

Actualmente se adelantan estudios genéticos comparativos que relacionan y cifran la composición genética, tanto de las especies patógenas (*Leptospira interrogans* y *L. borgpetersenii*) como las saprófitas (*Leptospira biflexa*) que orientan acerca del comportamiento de cada gen y la funcionalidad de los mismos [1].

Con el objetivo de conocer aspectos epidemiológicos importantes de esta enfermedad en los carnívoros menores que se encuentran en tratamiento en el Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburrá (CAV ï AMVA), y teniendo en cuenta su impacto en la salud pública y posible papel epidemiológico como reservorios de la misma, se realizó este estudio para determinar la presencia de *Leptospira* spp, si ésta es patógena o no y los serovares frecuentemente encontrados en los individuos de las familias procyonidae, mustelidae y felidae alojados en este Centro.

Mediante la prueba de Micro aglutinación Lisis (MAL) se encontraron títulos de anticuerpos en ocho individuos de la especie *Leopardus pardalis*, dos *Potos flavus* y un *Nasuela olivacea*. Sin embargo solo se consideró un caso positivo por el incremento de cuatro veces el valor inicial de los títulos para el serovar **Canicola** en *L. pardalis*, desde 1:400 a 1:1600.

Palabras clave: Campo oscuro, carnívoros menores, cultivo, *Leptospira* spp., prueba de microaglutinación lisis.

Presence of circulating *Leptospira* spp. in mustelids, procyonids and wild felidae from the ñCentro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburráò, Colombia.

Abstract

Leptospirosis is the most widespread bacterial zoonosis worldwide and is caused by spirochetes from the *Leptospira* genus. This spiroquetes have been detected in almost every mammalian species which has been examined and on every continent except Antarctica [1ï 3].

The understanding of leptospiral pathogenesis lags far behind that of many other bacterial pathogens [1].

Currently comparative genetic studies linking and encrypting genetic composition of both pathogenic species (*Leptospira interrogans* and *L. borgpetersenii*) as saprophytes (*Leptospira biflexa*) are being developed to advise on the behavior and functionality of each gene [1].

In order to learn important epidemiological aspects of this disease in small carnivores undergoing treatment at the ñCentro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburráò (CAV - AMVA), and taking into account its impact on public health and possible epidemiological role as reservoirs of the disease, this study was performed to determine the presence of *Leptospira* spp, whether it is pathogenic or not and serovars frequently found in individuals from the procyonidae, felidae and mustelidae families housed at this Centre.

By microagglutination test (MAT) antibody titers were found in eight individuals of the *Leopardus pardalis* species, two *Potos flavus* and one *Nasuela olivacea* species. However, there was only one case considered as positive by the increase of four times the initial **Canicola** serovar titers in *L. pardalis*, from 1: 400 to 1: 1600.

Keywords: Culture, Dark-field, *Leptospira* spp., microagglutination test, small carnivorous.

Introducción y Estado del arte

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica más ampliamente distribuida del planeta. Éstas bacterias con forma de espiroquetas han sido detectadas en casi todas las especies de mamíferos que han sido muestreadas y en todos los continentes del mundo excepto en la Antártida [1ï 3].
Su comprensión dista ampliamente de los avances y estudios de otras enfermedades de origen bacteriano [1].

Alrededor del mundo ocurren anualmente más de un millón de casos de leptospirosis severa. A pesar de la sensibilidad de la *Leptospira* a antibióticos tales como los ***b***-lactámicos y las tetraciclinas, tasas de mortalidad por encima del 20% continúan en regiones del mundo con una pobre infraestructura del sector salud, con tasas de fatalidad tan altas como el 70% para el síndrome de hemorragia pulmonar severa causada por *Leptospira* [1,4].
Además del riesgo zoonótico, la leptospirosis es causal de grandes pérdidas económicas en producción animal, especialmente en cerdos y ganado bovino, la mayoría a través de pérdidas reproductivas debidas a abortos y fallas en el desarrollo post-natal y levante [1,5].

Actualmente se adelantan estudios genéticos comparativos que relacionan y cifran la composición genética, tanto de las especies patógenas (*Leptospira interrogans* y *L. borgpetersenii*) como las saprófitas (*Leptospira biflexa*) que orientan acerca del comportamiento y función de cada gen. Estos últimos estudios genéticos y moleculares han aportado mayor entendimiento acerca de los diferentes mecanismos de transmisión de las especies patógenas de *Leptospira*. *L. interrogans* causa leptospirosis severa y puede ser transmitida por animales portadores a otros animales o humanos por contacto directo con orina infectada o, más comúnmente, a través de agua contaminada [1,4,5]. Este modo de transmisión requiere por tanto, de la habilidad de la bacteria de sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo hasta encontrar un nuevo huésped. Por otro lado, la *L. borgpetersenii* tiene poca persistencia en el ambiente de tal manera que ha

desarrollado un modo de transmisión que requiere mayor contacto directo; Esto concuerda, como se menciona en estudios recientes, con la reducción de un número de genes involucrados con la capacidad de la espiroqueta para sobrevivir en el ambiente, por largos períodos de tiempo [1].

Hay también numerosos serogrupos de *Leptospira* patógenas, los cuales no muestran la misma virulencia para las diferentes especies animales (como es el caso de mayor frecuencia de infección causada por los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Canicola en caninos). Inclusive, cada uno de los serovares de un serogrupo específico, pueden estar en mayor o menor medida asociados a casos de leptospirosis clínica; por ejemplo Copenhageni en el serogrupo Icterohaemorrhagiae o Saxkoebing en el serogrupo Sejroe[2,6,7].

La presión virulenta de la *Leptospira* depende del medio ambiente; Leptospiras dispersadas por animales silvestres pueden permanecer en el ambiente por más de seis meses en aguas frescas templadas (lagos, ríos y estanques). En zonas más secas hay menor carga bacteriana [3,5,6].

Los mapaches han sido reportados como reservorios de la bacteria, específicamente del serovar Grippotyphosa [2,8,9]. También se reportan en mapaches los serovares Pomona, Canicola, Australis, Pyrogenes, Ballum y Autumnalis. En coatis se reportan los serovares Cophenhageni y Shermani [9].

En mustélidos se ha reportado la enfermedad [10], y se han encontrado los serovares Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Australis.

Se ha reportado en félidos serovares como Icterohaemorragiae, Canicola, Hardjo, Australis, Autumnalis, Pomona, Ballum, Grippotyphosa, Cynopteri, Copenhageni y Patoc [2].

A: *Leopardus pardalis;* Felidae, **B:** *Eira barbara;* Mustelidae, **C:** *Potos flavus*, **D:** *Nasua nasua,* **E:** *Procyon cancrivorous;* Procyonidae.

Fotos cortesía de Andrés Arias Alzate, M.Sc. Biólogo PhD(est.), Laboratorio de Análisis Espaciales, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacan, C.P. 04510, México D.F., (52-55) 56247880 México, (52) 5534359468 México.

Grupo de Mastozoología-CTUA, Universidad de Antioquia, http://www.mastozoologiaudea.com/index.php, Grupo Ecología y Conservación de Fauna Silvestre, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Aburra Natural

Historia Natural y Biodiversidad del Valle de Aburrá. http://aburranatural.org/, Tels: (57-4) 4123751, Colombia, (57) 3003148069 Colombia

Debido al carácter reemergente y zoonótico de la leptospirosis, además de su amplia distribución en especies silvestres y domésticas, se considera importante estudiar su comportamiento epidemiológico en los mamíferos que se encuentran en el CAV AMVA, los cuales pueden actuar como hospederos de mantenimiento o accidentales y focos de transmisión de la bacteria a otras especies animales

alojadas en el Centro, al personal que labora en el mismo y a las especies en vida libre en caso de que las mantenidas en el Centro, fuesen liberadas. Por esto es necesario determinar la presencia de *Leptospira* spp. en los animales mantenidos en cautiverio, además de relacionar la sintomatología que puede desarrollar la infección en algunos individuos, como información útil para realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, y de esta forma establecer medidas efectivas de control y prevención, evitando así futuros brotes.

En el 2007 se reportó la presencia de leptospirosis en monos *Cebus sp* y se confirmaron 16 casos positivos (30,7%) por *Leptospira interrogans* [(11).] En el estudio se determinó que el brote fue causado por la población de rata café (*Rattus norvegicus*) establecidas en el ambiente, en la misma zona donde se encontraban los encierros de los monos. En otro estudio realizado en Brasil, entre el año 2002 y 2006, se reportó la presencia de *Leptospira* spp. en carnívoros silvestres, con una seropositividad del 42.67% y entre los cuales se encontraban las especies *Procyon cancrivorous* y *Leopardus pardalis*, con seropositividades de 50% (6/12) y 75% (3/4) respectivamente [(9).] El estudio menciona que las características de la zona, como altas temperaturas (27 - 28°C) y extensos períodos de inundación, favorecieron la persistencia y transmisión de las especies de *Leptospira* spp*.* [(9).] Sin embargo, actualmente se encuentran pocos estudios sobre la presencia de *Leptospira* spp. en mustélidos, prociónidos y félidos lo cual hace prioritario el desarrollo de investigaciones de leptospirosis en dichas especies.

Debido a las condiciones del Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburrá, se pretende con este estudio determinar la presencia de *Leptospira* spp. circulante en carnívoros silvestres pertenecientes a las familias Procyonidae, Mustelidae y Felidae alojados allí, y establecer los serovares de *Leptospira spp*. encontrados en las diferentes especies animales muestreadas, mediante la prueba de microaglutinación lisis (MAL) y determinar la presencia de *Leptospira* patógena en cultivos positivos de orina de los mismos.

Objetivo general

Determinar la presencia de *Leptospira spp.* circulante en carnívoros silvestres pertenecientes a las familias Procyonidae, Mustelidae y Felidae del Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburra.

Objetivos específicos

Establecer los serovares de *Leptospira* spp. encontrados en las diferentes especies animales muestreadas, mediante la prueba de microaglutinación lisis (MAL).

Determinar la presencia de *Leptospira* patógena en cultivos positivos de orina de Prociónidos, Mustélidos y Félidos muestreados.

Materiales y métodos

Aval del Comité de Ética para la experimentación animal

Los investigadores trabajaron bajo el compromiso del cumplimiento a cabalidad de la Declaración Universal de los Derechos del Animal, Resolución Nº 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia en la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, y la Ley 84 de 1989 por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales. De igual forma, los investigadores y co-investigadores, como Médicos Veterinarios, Médicos Veterinarios y Zootecnistas y Bacteriólogos en ejercicio, trabajaron bajo el compromiso de seguir los lineamientos que la Ley 576 de 2000, correspondiente al Código de Ética para el ejercicio profesional de dichas áreas, teniendo en cuenta que los procedimientos fueron realizados de acuerdo a lo establecido por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA), en el marco de la resolución rectoral N° 0018 de la Universidad CES.

Tipo de estudio

Estudio observacional, descriptivo transversal. El tamaño de la muestra fue de 26 animales pertenecientes a las tres familias propuestas para el proyecto; prociónidos, mustélidos y félidos. Como se indica en la **tabla 1**.

Tabla 1. Número de individuos incluidos en el estudio discriminados por Familia y Especie.

FAMILIA		ESPECIE	N° DE INDIVIDUOS
Procyonidae	-	Mapache *(Procyon cancrivorus)*	2
	-	Olingo *(Basaricyon gabbii)**	3
	-	Perro de Monte *(Potos flavus)*	7
	-	Cusumbo solo *(Nasua nasua)*	1
	-	Cusumbo Andino *(Nasuela olivacea)*	2**
Mustelidae	-	Hurón *(Eira barbara)*	1
Felidae	-	Ocelote *(Leopardus pardalis)*	10
Total			**26****

*Respecto al género *Basaricyon* una revisión taxonómica en el año 2013 revela que los individuos incluidos en este estudio pertenecen más probablemente a las especies *B. neblina* y *B. medius* debido al lugar de procedencia, ya que *B. gabbii* ya no se encuentra en Colombia. Por lo tanto nos referiremos a estos individuos en el desarrollo de este artículo como *Bassaricyon* sp. [12].

**Durante el estudio un individuo de la especie *Nasuela olivacea* alojado en el centro falleció por causas ajenas al estudio. Por lo tanto el tamaño de la muestra se redujo de 26 a 25 individuos. Este individuo fue posible incluirlo en el primer muestreo más no el segundo.

Localización

El Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburra (CAV - AMVA) se encuentra localizado en el municipio de Barbosa (Antioquia); De acuerdo a la clasificación de las zonas de vida realizadas por C. R. Holdrige, el municipio de Barbosa se encuentra en la zona de vida bosque húmedo premontano (bh-pm), bosque húmedo premontano bajo (bh-pmb) y bosque húmedo montano (bh-m). La altura sobre el nivel del mar oscila entre los 1.300 y 1.500 metros. La temperatura promedio es de 22º grados centígrados, la precipitación promedio anual es de 2.000 mm. Los meses más lluviosos abril y octubre, los meses más secos diciembre y marzo.

Al centro ingresan animales procedentes de distintas regiones del país, producto de entregas voluntarias y decomisos, que probablemente han sido sometidos a condiciones de estrés y manejo inadecuado, al mismo tiempo pudiendo estar expuestos a diferentes serovares de *Leptospira* spp.

Métodos

Todos los procedimientos de manejo de los animales y toma de muestras fueron realizados por personal capacitado y entrenado. La obtención de muestras de sangre y orina se realizó con el animal bajo sedación y desinfección previa de la zona de extracción de la muestra.

Los animales fueron capturados con nasas y restringidos físicamente por el personal capacitado, se restringieron químicamente cuando se hizo necesario bajo diferentes protocolos de Ketamina clorhidrato (10-15 mg/Kg), Xilacina (0,5 mg/Kg) y/o Diazepam (0,5 mg/Kg) para la toma de muestras, como se observa en la **tabla 2**. Se realizaron modificaciones en la dosificación de acuerdo a la necesidad de cada individuo y la experiencia de la Médica Veterinaria encargada.

Tabla 2. Dosis de sedación y vía de administración para las diferentes familias de animales del estudio.

Familia	Fármaco			Vía de administración
	Ketamina (mg/kg)	Diazepam (mg/kg)	Xilazina (mg/kg)	
Procionidae [13]	10	-	2	IM
Mustelidae [13]	10-20	1-2	-	IM
Felidae [14]	10-12	-	1-2	IM

(13i 15)

Cultivo de cepas de referencia de Leptospira. Las cepas de referencia de *Leptospira* spp. se replicaron e incubaron a temperaturas entre 26 y 30° C hasta cuando alcanzaron crecimiento igual al estándar 0,5 de MacFarland en medio líquido EMJH (Elling-haused-McCullough-Johnson-Harris) (Becton-Dickinson, Sparks, MD.USA), suplementado con 10% de medio de enriquecimiento (Becton-Dickinson-Biosciences). En el ICMT-CES sabaneta se tienen 22 cepas saprófitas y patógenas de referencia internacional, donadas por la fundación Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ) de Brasil. Los datos de serogrupo, serovares y nombre de cada cepa utilizada se describen en la **tabla 3.**

Tabla 3. Cepas de referencia de *Leptospira* spp del ICMT-CES

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa	Característica
L. interrogans	Australis	Bratislava	Jez Bratislava	Patógena
L. borgpetersenii	Ballum	Castellonis	Castellon 3	Patógena
L. borgpetersenii	Ballum	Ballum	Mus 127	Patógena
L. interrogans	Bataviae	Batavie	Van tienen	Patógena
L. interrogans	Canicola	Canicola	H. Ultrecht IV	Patógena
L. weilii	Celledoni	Celledoni	Celledoni	Patógena
L. kirschneri	Cynopteri	Cynopteri	3522C	Patógena
L. interrogans	Djasiman	Djasiman	Djasiman	Patógena
L. kirschneri	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster	Patógena
L. interrogans	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	Patógena
L. interrogans	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	Patógena
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20	Patógena
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	Patógena
L. borgpetersenii	Javanica	Poi	Poi	Patógena
L. noguchii	Louisiana	Louisiana	LSU 1945	Patógena
L. noguchii	Panama	Panama	CZ 214K	Patógena
L. interrogans	Pomona	Pomona	Pomona	Patógena
L. interrogans	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	Patógena
L. biflexa	Semaranga	Patoc	Patoc 1	**Saprófita**
L. santarosai	Shermani	Shermani	1342 K	Patógena
L. borgpetersenii	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin	Patógena
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	L 1130	Patógena

Obtención de muestras de sangre y orina

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de las venas yugular, cefálica, safena, femoral, según el caso. Se realizó con cada una de las muestras de cada individuo, hemograma completo y química sanguínea en el laboratorio de las instalaciones del CAV ï AMVA y los sueros fueron transportados inmediatamente al ICMT-CES para su análisis y procesamiento.

Para la toma de muestra de orina se realizó palpación abdominal en hembras para determinar el contenido vesical, de ser positivo, se procedió con la desinfección de la zona a intervenir con una solución de Clorhexidina al 1% y mediante un procedimiento aséptico se realizó punción vesical para obtener la muestra. En

machos se realizaba también palpación abdominal para posteriormente introducir una sonda Nelaton por el meato urinario externo en iguales condiciones asépticas como se mencionó para las hembras. De no ser posible la obtención de la muestra de orina mediante sonda urinaria se procedía a realizar punción vesical. Al igual que los sueros, las muestras de orina eran remitidas inmediatamente al ICMT-CES.

Procesamiento de las muestras de sangre. Cada una de las muestras era debidamente identificada con el código consecutivo correspondiente del laboratorio del CAV - AMVA y procesada inmediatamente después de la toma de muestras. A cada individuo se le realizó hemograma completo (hematocrito, hemoglobina, conteo de células rojas, conteo de células blancas; valores relativos y absolutos para neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos, y química sanguínea (AST, ALT, Creatinina, Urea y BUN). La cantidad de muestra obtenida por animal era la necesaria para ser procesada en el centro y enviar el suero para su posterior análisis en el ICMT ï CES, no mayor al 1% del peso vivo de cada individuo.

Procesamiento de las muestras de orina para el aislamiento de Leptospiras. El cultivo de las muestras de orina se realizó en las condiciones asépticas establecidas en el ICMT-CES, ya que el crecimiento de bacterias ambientales y contaminantes acidifican el medio de cultivo e impiden el crecimiento de *Leptospira* spp.

Para el aislamiento de *Leptospira* spp. se utilizó el medio de cultivo semisólido de fletcher [16] y se agregaron 200 ul de orina total [16,17].

A estos cultivos se les realizó seguimiento por microscopía de campo oscuro cada 8 días durante 3 meses, después de los cuales si no se observaban formas compatibles con *Leptospira* spp. el cultivo se reportaba como negativo, y en caso de observar espiroquetas compatibles con *Leptospira* spp. se reportaba como positivo [16,17].

Evaluación de la respuesta serológica. Para el procedimiento de la prueba MAL, los sueros de las muestras no debían estar hemolizados, las cepas que se manejan en el laboratorio debían tener un crecimiento adecuado en los medios, para evitar así falsos negativos; además debían estar libres de contaminación, pues esta posibilita la presentación de falsos positivos.

El Test de Microaglutinación Lisis (MAL) es el método de diagnóstico estándar de referencia internacional (OIE) para la confirmación serológica de infección por *Leptospira* spp. [4,17ï 19].

En la estandarización del MAL, es muy importante considerar:

- La densidad correcta del cultivo usado como antígeno. Esta densidad debe ser aproximadamente de 1,5 a 2x108 Leptospiras.
- La determinación del título final de la aglutinación.

Una vez revisados los cultivos, se eligen aquellos que tengan buen crecimiento y no formen aglutinaciones entre ellas. Cuando los cultivos están muy densos se deben diluir con buffer fosfato salino PBS pH 7,2 - 7,4 o solución salina fisiológica 0,85%. Para que el antígeno sea óptimo para la prueba tiene que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150 a 200 Leptospiras por campo o hasta lograr una opalescencia de 0,5 de la escala de Mac Farland [17,19].

La prueba se basa en enfrentar diluciones seriadas de suero con igual volumen de una suspensión de Leptospiras (antígeno) para luego observarse en microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo [17,19].

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR múltiple permite diagnosticar *Leptospira* spp. en muestras de sangre u orina de animales y humanos por medio de la detección del genoma bacteriano [20], en este caso identificando dos amplificadores específicos 16S y lipL32. La presencia del gen 16S identifica molecularmente a la bacteria como *Leptospira* spp., mientras que el lipL32 permite determinar si es una especie saprofita o patógena [20,21], ya que el gen lipL32 se encuentra en una lipoproteína de membrana externa presente solo en las especies patógenas de *Leptospira* spp.[20,21].

Extracción del ADN genómico. El ADN para las pruebas moleculares fue extraído con un estuche comercial (Wizard Genomics Promega**,** Madison WI**.** USA), siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas pero con algunas modificaciones. En el procedimiento se utilizó RNAsa a 37°C por 30 minutos y posteriormente se adicionó Proteinasa K a 65°C dejándose incubar durante la noche. Posterior a la extracción, el ADN se rehidrataba con Buffer Tris-EDTA, y se almacenaba a 4°C hasta el momento de su uso [19,22].

Perfil térmico PCR múltiple

Tabla 4. Descripción de los perfiles térmicos y reactivos de PCR múltiple con rRNA16S *rrs* y *lipL32* estandarizadas en el laboratorio ICMT ï CES Sabaneta (datos sin publicar)[22].

Perfil Térmico	T°C	Tiempo	Reactivo	Volumen	Concentración
Desnaturalización	94°C	5 min	Buffer PCR (KCL)	3,5 µl	1X
Ciclado	35 ciclos		MgCl2	4,2 µl	2,5mM
T° inicial	94°C	45 seg	Primer F16S	0,5 µl	1,0 µM
Anillamiento	57°C	1 min	Primer R16S	0,5 µl	1,0 µM
Extensión	72°C	1 min	lipL32 F	3,5 µl	1,0 µM
Extensión Final	72°C	5 min	lipL32 R	3,5 µl	1,0 µM
			DNTPs	1,0 µl	0,2 mM
			Taq Pol	0,4 µl	1 U
			H2O	9,0 µl	
			DNA	4 µl	**VF= 30 µl**

Electroforesis [19,22]. Los productos PCR, se visualizan mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa con una concentración de 1,5%, usando buffer TBE (Tris- Base, EDTA, ácido bórico) a una concentración de 1X, se revela con Bromuro de Etidio y se emplea un GeneRulerÊ de 50pb DNA Ladder. Posteriormente se realiza la corrida electroforética a 80V durante 1 hora en cámara de electroforesis horizontal y por último se visualiza en un analizador de imagen Epichemi3.

Las muestras con *Leptospira* patógena amplifican un producto de 423 pb y de 331 pb, de solo ser especies saprofitas amplifican un producto de 331 pb indicando que carece de la lipoproteina LipL32.

Todas las muestras y pruebas diagnósticas para *Leptospira spp*. anteriormente mencionadas fueron procesadas en el laboratorio del ICMT-CES por profesionales especialistas. Cada uno de los animales fue identificado con un código, las personas encargadas del procesamiento de muestras, desconocían información clínica de cada uno de los individuos, para evitar sesgo por parte del laboratorio.

Análisis Estadístico. Los datos de cada individuo con los respectivos resultados, se consignaron en una base de datos de Microsoft Excel® y se analizaron mediante el programa estadístico R.

Se realizó estadística descriptiva para obtener medidas de tendencia central: media, moda y mediana de los serovares de Leptospirosis en la población de prociónidos, mustélidos y félidos del CAV. Se establecieron proporciones para las variables clínicas y demográficas. La variable títulos de anticuerpos se categorizó de acuerdo a un punto de corte definido teóricamente. Se crearon perfiles con base en la variable independiente (positivo o negativo a *Leptospira*) y el resto de variables que tuvieran asociación significativa mediante un análisis de correspondencia. Se aplicaron pruebas para verificar distribución normal de los datos y, de acuerdo a los resultados se aplicaron pruebas ANOVA o no paramétricas para identificar asociación estadísticamente significativa entre las variables de interés.

Resultados

Los individuos muestreados pertenecían a la familia de los Prociónidos en un 56% (n=14), Félidos en un 40% (n= 10) y Mustélidos en un 4% correspondiente a un individuo. Las especies incluidas con mayor participación fueron

Leopardus pardalis (40%) y *Potos flavus* (28%) como puede observarse en la **tabla 5.** De estos animales el 56% eran hembras, el 73% de los especímenes incluidos en el estudio eran adultos, 15,5% y 11,5% juveniles e infantiles, respectivamente.

Del 60% de los animales se desconoce el lugar de origen, el 36% provenía de algún municipio de Antioquia y un individuo (4%) del departamento del Chocó.

Tabla 5. Variables hematológicas determinadas por hemograma de acuerdo a la especie.

Especie	N	%	RBC	Hto	Hb	WBC	Plaquetas
Mustélidos							
Eira barbara	1	4	8,89	44,56	15,30	13,48	579,00
Prociónidos							
Bassarycion gabbii	3	12	8,75	46,09	16,23	14,43	583,00
Nassuella olivacea	1	4	11,80	38,67	13,30	7,62	214,00
Nasua nasua	1	4	12,36	37,73	13,10	10,76	587,00
Potos flavus	7	28	9,78	40,77	14,59	13,98	301,99
Procyon cancrivorus	2	8	8,76	42,85	14,90	12,08	529,50
Félidos							
Leopardus pardalis	10	40	8,76	41,29	14,46	10,51	278,20

RBC: Conteo de células rojas; **Hto:** Hematocrito;
Hb: Hemoglobina; **WBC:** Conteo de glóbulos blancos.

Tabla 6. Variables de la química sanguínea de acuerdo a la especie

Especie	N	%	ALT	AST	Creatinina	BUN	Urea
Mustélidos							
Eira barbara	1	4	56,00	152,00	0,66	13,70	29,30
Prociónidos							
Bassarycion sp.	3	12	77,33	150,67	1,20	9,30	20,00
Nassuella olivacea	1	4	187,00	175,00	1,19	7,70	18,60
Nasua nasua	1	4	157,00	176,00	0,93	7,10	17,20
Potos flavus	7	28	40,43	277,86	0,66	4,97	10,70
Procyon cancrivorus	2	8	145,00	93,50	0,93	21,00	45,00
Félidos							
Leopardus pardalis	10	40	40,00	42,40	1,35	34,87	72,75

* Los valores promedio de creatinina se obtuvieron con 23 individuos.
ALT: Alanina aminotransferasa; **AST:** Aspartato aminotransferasa;
BUN: Nitrógeno Ureico en sangre

Determinación de la respuesta de anticuerpos por MAL

Mediante la prueba de Micro aglutinación Lisis (MAL) se encontraron títulos de anticuerpos en ocho individuos de la especie *Leopardus pardalis*, dos *Potos flavus* y un *Nasuella olivácea,* lo que sugiere contacto previo con la bacteria.

En los félidos, sin embargo, solo se consideró positivo un caso de los ocho, para el serovar **Canicola** en *L. pardalis*, en el cual se encontró una cuadruplicación del título de anticuerpos, pasando de 1:400 a 1:1600.

En la familia de los prociónidos, se encontraron tres individuos positivos determinados por presentar una prueba negativa en la fase aguda y un título ascendente en la fase convaleciente. Un Cusumbo Andino *(N. ollivacea)* se encontró infectado para el serovar **Tarassovi**; un perro de monte (*P. flavus*) fue positivo a **Patoc** y otro *P. flavus* para el serovar **Ballum.** A pesar de que estos animales tenían títulos de anticuerpos para otros serovares, se consideró positivo para el serovar que tuviese mayor cantidad de anticuerpos.

No se encontraron individuos con anticuerpos para los serovares Grippotyphosa, Pomona y Bratislava. De las especies incluidas en el estudio se destaca que no se encontraron títulos en *Eira barbara, Nasua nasua, Bassarycion gabbii* y *Procyon cancrivorus*, como se observa en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Serovares de *Leptospira spp* contra los cuales se encontraron títulos de anticuerpos mediante la prueba de microaglutinación-MAT.

Especie	Patoc		Icterohaemorragiae		Canicola		Hardjo		Ballum		Santarosai		Pyrogenes		Cynopteri		Tarassovi	
Fase	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**	**A**	**C**
Prociónidos																		
Potos flavus	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Potos flavus	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1:100	*	1:50	*	1:25	*	1:25	*	*
Nassuella olivacea	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1:25
Félidos																		
Leopardus pardalis	*	*	*	*	*	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	1:50	1:100	1:400	1:1600	*	*	1:200	1:200	*	*	1:400	1:800	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	1:25	1:50	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	1:25	1:25	*	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	*	*	*	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	1:25	*	*	*	*	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	1:50	*	*	*	1:25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leopardus pardalis	*	*	*	*	*	*	*	*	1:50	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*****Negativo. **A:** fase aguda. **C:** fase convaleciente.

La prueba de PCR a partir del cultivo de la muestra de orina arrojó un resultado positivo en *Eira barbara*, de la familia de los mustélidos, aunque en la detección de anticuerpos fue negativo a los serovares estudiados.

Discusión

La prevalencia de *Leptospira spp*. (15,38%) no fue alta respecto a las reportadas en otros estudios en animales silvestres, teniendo en cuenta que provienen de diferentes regiones del país y han estado expuestos a un ambiente donde las condiciones son favorables para una gran población de roedores portadores.

Respecto al lugar de procedencia de los individuos muestreados el 36% provenía de diferentes municipios de Antioquia y un individuo del departamento del Chocó. Ambos departamentos cuentan con zonas consideradas endémicas para Leptospirosis [(4)]**.** Una de las dificultades con el manejo de estos individuos silvestres es la falta de información precisa acerca del lugar de procedencia, lo que serviría para determinar zonas de endemicidad para esta enfermedad en estas especies y contrastar con los casos reportados positivos en humanos. A pesar de la falta de información concisa pueden correlacionarse los resultados con estudios de prevalencia de *Leptospira* realizados en humanos en zonas como el Urabá Antioqueño y el departamento del chocó [(4)].

A pesar que cuatro animales fueron positivos para *Leptospira* por la prueba MAL, ninguno de ellos presentó valores alterados en los parámetros hematológicos o sanguíneos evaluados. Se tiene conocimiento acerca de la ausencia de sintomatología evidente de una enfermedad en animales silvestres en su medio natural, ya que esto lo puede convertir en presa fácil o situar en un estado de vulnerabilidad, por tanto esta puede ser una hipótesis acerca de la falta de evidencia clínica de la enfermedad en los individuos evaluados, más aún con pruebas de laboratorio que revelan la posibilidad de que estos animales actúen también como portadores asintomáticos o huéspedes adaptados para estas espiroquetas [(23)].

No se encontró sintomatología evidente en los especímenes muestreados, como anorexia, hemoglobinuria, anemia, ictericia y fiebre que determinara la presencia de la bacteria, evidenciando así que estas especies actúan como hospederos de mantenimiento y reservorios del patógeno.

De acuerdo con un estudio realizado en Brasil, entre el año 2002 y 2006, donde reportan una seropositividad del 42.67%[9], y estudios ulteriores, se encontró en este estudio una presencia de tan solo el 15.38% entre los cuales se destacan las especies *Leopardus pardalis*, *Nassuella ollivacea y Potos flavus* con cifras del 10% (1/10), 100% (1/1) y 28.57% (2/7) respectivamente. Debe considerarse que el estudio realizado en Brasil tuvo una duración de cuatro años y por lo tanto pudieron efectuarse más pruebas seriadas y de seguimiento, a diferencia del presente estudio donde solo fue posible la realización dos muestras pareadas [9].

Se ha reportado en félidos serovares como Icterohaemorragiae, Canicola, Hardjo, Australis, Autumnalis, Pomona, Ballum, Grippotyphosa, Cynopteri, Copenhageni y Patoc [2]. Únicamente se consideró positivo un félido para el serovar canicola en el presente estudio.

Es importante destacar que dentro del manejo de estos animales positivos a *Leptospira*, debe realizarse tratamiento con los medicamentos de elección como doxiciclina o ceftriaxona [4]; sin embargo, algunos centros de atención de fauna pueden definir dentro de sus protocolos el sacrificio como medida sanitaria [24]. Aunque si debe ser obligatorio un periodo de cuarentena hasta que se determine que el animal puede ser liberado mediante las diferentes pruebas de laboratorio y no se convierta en dispersor de estas espiroquetas al medio silvestre.

Respecto a la fuente de infección de *Leptospira* dentro del centro, debe destacarse que se presentan las condiciones medioambientales idóneas para el mantenimiento del microorganismo y la población de roedores portadores del mismo, tal como la rata café (*Rattus norvegicus*). Esta hipótesis puede dirigirse a los prociónidos que tuvieron una prueba MAL inicial negativa y luego empezaron a subir los títulos; pero no para el caso de los félidos, que pudieron llegar ya infectados al centro.

Como se mencionó anteriormente, es de vital importancia estandarizar los métodos de recolección de información de procedencia de los animales destinados a la atención en el Centro, y de esta forma ubicar una zona de

potencial riesgo de infección para *Leptospira* en el Departamento y relacionarlos con los casos registrados en humanos en dicha zona.

El cuadro clínico en humanos es difícil de caracterizar debido a la amplia diversidad de serovares y la influencia de variables tanto internas como externas al individuo afectado [25]. En animales la situación parece ser similar complicando la identificación de un caso de manera temprana; más aún en fauna silvestre que enmascara sintomatología. Esto conlleva a la necesidad de establecer el diagnóstico de *Leptospira* como prueba de rutina previo a los protocolos de liberación y reubicación en los Centros de atención de fauna; teniendo en cuenta su carácter zoonótico y su importancia en salud pública.

La leptospirosis es una enfermedad que requiere mayor investigación por lo tanto es prioritario realizar estudios epidemiológicos e identificar patrones de incidencia global teniendo en cuenta cada uno de los actores involucrados en esta zoonosis, para así mejorar las prácticas de prevención. También incluir el análisis de diversas fuentes de agua del centro y microhabitats en la periferia del Centro que pudiesen actuar como depósito de espiroquetas tanto patógenas como saprófitas; e infectar mamíferos de vida libre potenciales portadores de estas[5].

A pesar de la gran población de roedores presente en las instalaciones del centro y la presencia de mamíferos silvestres, este estudio no arroja una prevalencia muy alta de *Leptospira* circulante. Se recomienda realizar sondeos epidemiológicos periódicos para ejercer vigilancia sobre la enfermedad. Procurar no liberar o reintroducir animales con títulos positivos relevantes a ecosistemas donde tendrán contacto directo con otros animales silvestres y población humana.

Conclusiones

Se determinó la presencia de *Leptospira spp.* circulante en carnívoros silvestres pertenecientes a las familias Procyonidae y Felidae del Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del Área Metropolitana Valle de Aburra. A pesar del resultado arrojado por la prueba de PCR como positivo a partir del cultivo de la muestra de orina del *Eira barbara,* de la familia de los mustélidos, no fue posible determinar la presencia de la espiroqueta en ésta familia, puesto que fue negativo en la detección de anticuerpos respecto a los serovares estudiados.

Mediante la prueba de microaglutinación lisis (MAL) se encontraron títulos de anticuerpos en ocho individuos de la especie *Leopardus pardalis*, sin embargo, solo se consideró positivo un caso de los ocho, para el serovar **Canicola;** dos *Potos flavus,* uno fue positivo a **Patoc** y otro para el serovar **Ballum;** y un *Nasuella olivácea* se encontró infectado para el serovar **Tarassovi**.

A pesar de que estos animales tenían títulos de anticuerpos para otros serovares, se consideró positivo para el serovar que tuviese mayor cantidad de anticuerpos.

No fue posible determinar la presencia de *Leptospira* patógena en los cultivos positivos de orina de Prociónidos, Mustélidos y Félidos muestreados.

Agradecimientos

Al personal médico veterinario, la bacterióloga y el grupo de apoyo del Centro de Atención y Valoración de fauna silvestre del valle de aburrá (CAV AMVA), al Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT-CES), Medellín, Colombia y a la Doctora Janeth Pérez García. Igualmente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES quien junto con el CAV financió el proyecto.
Un agradecimiento muy especial al Doctor Carlos Muskus por su revisión desinteresada, guía y apoyo incondicional.

Referencias Bibliográficas

1. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. Vet Microbiol. 2011 Nov 21;153(1ï 2):73ï 81.

2. Ullmann LS, Hoffmann JL, de Moraes W, Cubas ZS, Santos LC dos, da Silva RC, et al. SEROLOGIC SURVEY FOR LEPTOSPIRA SPP. IN CAPTIVE NEOTROPICAL FELIDS IN FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRAZIL. J Zoo Wildl Med. 2012 Jun;43(2):223ï 8.

3. Agudelo Flórez P, Ocampo M, Loaiza J, Pérez J, Jiménez-Nicholls L. Determinación de la frecuencia de leptospirosis en felinos y primates del parque zoológico santa fe, Medellín, Colombia. 2012 Sep 14 [cited 2014 Apr 11]; Available from: http://bdigital.ces.edu.co:8080/repositorio/handle/10946/556

4. Agudelo P, Arboleda M, Restrepo B, Gaviria J, Quevedo V, Restrepo C. DESCRIPCION DEL CURSO CLINICO Y ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS EN PACIENTES HOSPITALIZADOS CON LEPTOSPIROSIS EN EL URABA ANTIOQUEÑO, 2007 [Tesis de grado]. [Medellín]: CES; 2008.

5. DIESCH SL, McCULLOCH WF. Isolation of Pathogenic Leptospires From Waters Used for Recreation. Public Health Reports. 1966 Apr;81.

6. Fontaine A, Geneviève. Canine leptospirosisð Do we have a problem? Vet Microbiol. 2006 Oct 5;117(1):19ï 24.

7. Jiménez Nicholls Lina, Pérez Juliana, Loaiza Juliana, Ocampo Martha, Agudelo Flórez Piedad. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN FELINOS Y PRIMATES DEL PARQUE ZOOLÓGICO SANTA FE, MEDELLÍN, COLOMBIA. Enero - Junio 2009. 4:39 a 47.

8. López J, Abaunza N. Seroprevalencia y serotipificación de la leptospirosis canina en el albergue La Aurora de la ciudad de Medellín. Universidad CES; 2006.

9. Silva R, Ferreira F, Soares J, De Arruda S, De Souza E, De Morais ZM, et al. Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to Leptospira spp in the northen Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Jaineiro. 2011;106 (4).

10. Wallach JD, Boever WJ. Diseases of Exotic Animals: Medical and Surgical Management. Saunders; 1983.

11. Szonyi B, Agudelo P, Ramírez M, Moreno N. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (Cebus) monkeys. Vet J. 2010;

12. Helgen KM, Pinto CM, Kays R, Helgen LE, Tsuchiya MTN, Quinn A, et al. Taxonomic revision of the olingos (Bassaricyon), with description of a new species, the Olinguito. ZooKeys. 2013;1 ï 83.

13. Murray E. Fowler, editor. BIOLOGY, MEDICINE, AND SURGERY OF SOUTH AMERICAN WILD ANIMALS. 2001st ed. 2121 South State Avenue, Ames, Iowa 50014: Iowa State University; 2001.

14. Varela N. Aspectos Básicos del Manejo Médico de los Pequeños Felinos del Neotrópico. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional: Neonatología y Experiencias de Jóvenes Investigadores. 2009.

15. Carpeter JW. Exotic animal formulary. Exotic animal formulary. Fourth edition. USA. St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2012. p. 567 ï 568.

16. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. GUÍA DE DIAGNÓSTICO LEPTOSPIROSIS. Medellín; 2011.

17. Céspedes M, Araujo MG. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Lima, Perú; 2002.

18. Agudelo P, Restrepo M, Lotero M. Evaluation of indirect immunofluorescence assay for diagnosis of human leptospirosis. Biomedica. 2006;26:216 ï 23.

19. Terpstra, W. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization;

20. Moreno N, Agudelo P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y multiple para la identificación de aislamiento de Leptospira spp en Colombia. Rev Peru Med Exp. 2010;27(4):548 ï 56.

21. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of Medical Microbiology. 2005;54:45ï 9.

22. Moreno N. Evaluación de pruebas moleculares para la caracterización y posterior tipificación hasta nivel de especie de aislados colombianos de Leptospira spp de humanos, animales y fuentes ambientales [Internet]. [Medellín]; 2011. Available from: (datos sin publicar)

23. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. NIH Public Access. 2009 Oct;736ï 47.

24. República de Colombia. Resolución 2064. Sect. Artículo 23.- De la Eutanasia como Medida de Disposición Final de Especímenes de la fauna silvestre Oct 21, 2010 p. 83.

25. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, et al. Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique Leptospira Associated with a Rattus Species Reservoir in the Peruvian Amazon. April 2 2008. 2008 Apr;2.