

Prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* spp. en personas con exposición laboral en el departamento del Tolima

Prevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies among people with occupational exposure in Tolima Department

Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em pessoas com exposição laboral no Departamento do Tolima

Blanca L. Guzmán-Barragán¹; Sandra M. Peña-Perdomo²; Roy F. Flórez-Rojas³; Diego F. Amado-Gómez⁴; Elkin M. Rodríguez-Ruiz⁵; Noel Verjan-García⁶.

¹ PhD, MSc, Médica Veterinaria Zootecnista, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: blancalissethguz@hotmail.com

² Bacterióloga, Laboratorio Departamental de Salud Pública, Secretaria de Salud del Tolima, Ibagué, Colombia. Correo electrónico: samipepe@hotmail.es

³ Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. Correo electrónico: royfloresmvz@gmail.com

⁴ Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima. Pasante del Programa Zoonosis, Secretaria de Salud del Tolima, Gobernación del Tolima, Ibagué, Tolima. Correo electrónico: diegoamadomvz@gmail.com

⁵ Médico Veterinario Zootecnista, Universidad del Tolima. Programa de Zoonosis, Secretaria de Salud del Tolima, Gobernación del Tolima, Ibagué, Tolima. Correo electrónico: elkmauro@gmail.com

⁶ MSc, PhD., Médico Veterinaria Zootecnista, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. Correo electrónico: nverjang@ut.edu.co

Recibido: 09 de Abril de 2015. Aprobado: 10 de Abril de 2016. Publicado: 20 de mayo de 2016.

Citación sugerida: Guzmán-Barragán BL, Peña-Perdomo SM, Flórez-Rojas RF, Amado-Gomez DF, Rodríguez-Ruiz EM, Verjan-García N. Prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* spp. en personas con exposición laboral en el Tolima y evaluación de la vigilancia epidemiológica. Rev. Fac. Nac. Salud Pública 2016; 34(2): 156-166. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v34n2a04

Resumen

Objetivo: estimar la prevalencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp., mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), en la población de riesgo laboral de 8 municipios del Tolima. **Metodología:** se obtuvieron muestras de sangre de 261 empleados, las cuales fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti-*Leptospira* spp., seguido de MAT y serotipificación. **Resultado:** se estimó una seroprevalencia del 25,29%, con una seroreactividad mayor en trabajadores de plantas de

beneficio animal (34,2%), recolección de residuos sólidos (27,1%) y trabajadores de acueducto y alcantarillado (14,8%). La actividad en plantas de beneficio animal se identificó como factor de riesgo de *Leptospira* spp. (OR=1,86). Los serovares identificados fueron *L. Bratislava* (16), *Ballum* (5), *Tarassovi* (3), *Hebdomadis* (2), *Sejroe* (2) y *Icterhemorrhagiae* (1). El municipio de Libano presento el mayor porcentaje de positividad (36,96%), seguido de Espinal y Guamo con 28,57% cada uno. **Discusión:** la evaluación del sistema de

vigilancia indicó deficiencia en recursos y debilidades de los profesionales de la salud al desconocer los procedimientos, investigación, diagnóstico y notificación de la enfermedad. **Conclusiones:** la leptospirosis está presente en poblaciones de riesgo laboral en el Tolima y se hace necesario abordar

esta problemática en la población de otros municipios y los animales transmisores de la enfermedad. **Palabras clave:** *Leptospira*, vigilancia en salud pública, planes y programas de salud, evaluación en salud.

Abstract

Objective: to estimate the prevalence of IgM antibodies against *Leptospira* spp. Using the enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) in a population at occupational risk from 8 municipalities of the Tolima department, Colombia. **Methodology:** blood samples were collected from 261 employees and analyzed with the elisa technique to detect IgM and anti-*Leptospira* spp. antibodies. This was followed by mat and serotyping. **Results:** a seroprevalence of 25.29% was estimated, with higher seroreactivity for individuals working at slaughter plants (34.2%), collecting solid waste (27.1%) and those in contact with water and sewage waste (14.8%). Activity in slaughter plants was identified as a risk factor for *Leptospira* spp. (OR = 1.86). The serovars identified were L. Bratislava (16), Ballum (5), Tarassovi (3), Hebdomadis (2), Sejroe

(2), and Icterhemorragiae (1). The municipality of Libano had the highest percentage of positivity (36.96%), followed by Espinal and Guamo with 28.57% each. Discussion: assessment of the current surveillance system for leptospirosis indicated deficient resources and health professionals who are lacking in terms of knowledge regarding appropriate procedures, research on, diagnosis and reporting mechanisms for the disease. **Conclusions:** leptospirosis is present in public workers with occupational hazard in Tolima. In addition, this issue should be approached while taking into account the population from other municipalities as well as the animals associated with its transmission.

Keywords: *Leptospira*, public health surveillance, health programs and plans, health evaluation

Resumo

Objetivo: estimam a prevalência de anticorpos IgM contra *Leptospira* spp., por ensaio de ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA) na população de risco ocupacional de 8 municípios de Tolima. **Metodologia:** Coletaram-se amostras de sangue de 261 empregados, e analisaram-se com a técnica de ELISA para detectar anticorpos IgM anti-*Leptospira* spp., seguido de MAT e de serotipificação. **Resultados:** estimou-se uma seroprevalência de 25,29%, com seroatividade superior nos trabalhadores dos matadouros (34,2%), da recollecção de lixo sólido (27,1%), e nos trabalhadores dos esgotos (14,8%). A atividade nos matadouros foi identificada como fator de risco de *Leptospira* spp. (OR=1,86). Os serovares identificados foram L. Bratislava (16), Ballum K(5), Tarassovi

K(3), Hebdomadis (2), Sejroe (2) e Icterhemorragiae (1). O município de Libano apresentou a percentagem mais alta de positividade (36,96%), seguido por Espinal e por Guamo, com 28,57 cada um. **Discussão** a avaliação do sistema de vigilância revelou deficiência de recursos e fraquezas dos profissionais da saúde, porque desconhecem os procedimentos, a investigação, o diagnóstico e a notificação da doença. **Conclusão:** a leptospirosis está nas populações de risco laboral no Departamento do Tolima, o que faz necessário acometer este problema na população de outros municípios e nos animais transmisores da doença.

Palavras-chave: *Leptospira*, vigilância em saúde pública, planos e programas de saúde, avaliação de saúde

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica re-emergente de distribución mundial, que afecta a humanos y a una gran variedad de animales domésticos, principalmente caninos, bovinos y cerdos. Es una enfermedad altamente transmisible y de carácter endémico en varios países, con gran impacto en la salud pública [1]. La leptospirosis es causada por una espiroqueta del género *Leptospira* spp. y actualmente se conocen 20 especies y alrededor de 300 serovares, siendo el serovar *Icterohaemorrhagiae* uno de los más frecuentes en humanos [1, 2]. La *Leptospira* spp. coloniza los túbulos renales de los animales y es excretada a

través de la orina, se transmite por contacto directo o indirecto con la orina de animales contaminados, los cuales constituyen reservorios de esta enfermedad, o mediante la exposición a ambientes contaminados (agua y suelo) por la orina de animales infectados [2-4].

La leptospirosis tiene mayor incidencia en países con climas tropicales y subtropicales, particularmente en América Latina y el sureste de Asia [1], donde las condiciones socio-ambientales crean entornos propicios para el mantenimiento y sobrevivencia del patógeno [5]. La enfermedad se asocia con ambientes rurales y actividades laborales donde se tiene contacto con animales infectados, no obstante, el deterioro de las condiciones sanitarias en las zonas periurbanas y

urbanas, recientemente ha favorecido su diseminación [3, 6]. El cambio climático y en particular las lluvias y el fenómeno del niño también han influido en la ocurrencia de esta enfermedad [4]. La *Leptospira* spp. es el segundo patógeno más vinculado con brotes de enfermedad por eventos climáticos extremos por agua como lluvias fuertes e inundaciones, después de los brotes por *Vibrio* spp. [7].

La sintomatología de la leptospirosis se caracteriza por cuadros febriles agudos, con síntomas no específicos que pueden variar desde fiebre acompañada de cefalea y mialgias, hasta síndromes icterohemorrágicos con insuficiencia renal; sin embargo, puede presentarse de forma asintomática [2]. Los signos clínicos pueden sugerir infecciones por influenza, dengue, malaria, fiebre amarilla, rickettsiosis, meningitis aséptica, toxoplasmosis, fiebre tifoidea, hepatitis virales, entre otros, asimismo se han identificado coinfecciones de *Leptospira* spp. con dengue, *Brucella* y *Rickettsia* [2, 8, 9]. Por lo tanto, el cuadro clínico dificulta el diagnóstico por los profesionales de salud, hecho que conlleva al subdiagnóstico y subnotificación de la enfermedad.

En Colombia los estudios son limitados y la epidemiología de la enfermedad es en gran parte desconocida. En el Urabá Antioqueño se reportó una prevalencia del 12,5% [10]. Estudios focalizados a grupos de riesgo en las periferias de la ciudad de Cali reportaron una prevalencia del 23,3% [7], mientras que en trabajadores de alto riesgo ocupacional en Villavicencio y Córdoba se reportaron prevalencias del 19% y 13,1%, respectivamente [11]. En el departamento del Tolima la situación de la leptospirosis humana y animal es en gran parte desconocida y se cuenta con pocos registros debido a la subnotificación y a la oferta limitada de servicios médicos hospitalarios. Un análisis de las fichas de notificación, que residen en las secretarías de salud, permitió estimar una prevalencia del 19,8% para esta región, los casos provenían principalmente de la zona urbana y de la región central, aspecto que puede estar relacionado con los sitios de mayor cobertura de sistema de salud [12].

El diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad constituye un gran desafío para los servicios médicos hospitalarios debido al curso inespecífico de la enfermedad y a los complejos procedimientos diagnósticos [2, 13, 14]. En algunos países de la Región de las Américas, la inclusión de la leptospirosis como enfermedad obligatoria es reciente, muchos de los cuales no poseen adecuados laboratorios de diagnóstico y sistemas de vigilancia epidemiológica, ineficiencia que muestra gran vulnerabilidad y deficiente reporte de la enfermedad [14]. A partir del año 2007 la notificación de la leptospirosis es

obligatoria en Colombia, la cual ha mostrado un aumento significativo de los casos; sin embargo, la notificación aún no es representativa y el impacto económico y social de la misma es desconocida [15].

El presente estudio buscó estimar la prevalencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp., mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), en la población de riesgo laboral de 8 municipios del Tolima, seguido de la prueba de microaglutinación (MAT). El estudio incluyó la evaluación de la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, con el fin de identificar los problemas en el reporte de los casos y generar medidas para fortalecer la vigilancia.

Metodología

Se implementó un estudio descriptivo de corte transversal para estimar la prevalencia de anticuerpos IgM en la población de riesgo laboral de 8 municipios del departamento del Tolima, entre el mes de noviembre de 2013 a marzo de 2014. En el Tolima, según el conocimiento de los autores, no se han llevado a cabo estudios de prevalencia de leptospirosis humana y animal, por lo tanto, esta investigación constituye una primera aproximación a la enfermedad y un estudio piloto de seroprevalencia en algunos municipios del Tolima.

Población

El estudio se realizó en el departamento del Tolima, localizado en la región Andina sobre la cordillera occidental y central de Colombia, territorio que presenta diferentes pisos térmicos y una alta actividad agropecuaria. Este estudio se llevó a cabo en el 100% de la población con riesgo laboral e incluyó a trabajadores de plantas de beneficio animal, recolección de residuos sólidos, alcantarillado y acueducto de 8 municipios. El Tolima cuenta con 47 municipios, para este estudio se seleccionaron municipios intermedios entre los 10.000 a 100.000 habitantes categorías 3, 4 y 5, según la Ley 617/2000, que realizaran las 3 actividades con población de riesgo, y que presentaran un alto porcentaje de casos sospechosos de leptospirosis en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA).

El muestreo serológico y la ejecución de la encuesta epidemiológica se llevó a cabo con el apoyo y participación de las empresas con población de riesgo laboral en cada municipio. En total se muestrearon 261 individuos, de los cuales el 18,77% procedían del municipio de Chaparral, 10,34% de Mariquita, 7,66% de Lérica, 10,73% del Guamo, 5,75% de Saldaña, 26,82% del Espinal, 17,62% del Líbano y el 2,31% de Piedras.

Análisis de Inmunoabsorción Ligado a Enzima – ELISA

La detección de *Leptospira* spp. se realizó mediante la prueba de ELISA, la cual presenta una sensibilidad del 89,47 % y especificidad del 100% [16]. Se tomaron 5 mL de sangre en tubos vacutainer® a partir de la vena cubital de cada uno de los individuos como muestra, siendo procesadas en el Laboratorio de Salud de Pública del Tolima. Posterior a la coagulación de la sangre, los tubos fueron centrifugados a 3.500g por 10 minutos a temperatura de 23°C (*Thermo scientific Multifuge X1R*), se colectó el suero sanguíneo y se preservó a -20°C hasta su uso.

La prueba ELISA se llevó a cabo con el paquete VIRION/SERION específico para *Leptospira* spp., de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (*Institut Virion/Serion GmbH*, Wurzburg, Alemania). Las placas cubiertas con el antígeno fueron incubadas con 100 µl de suero diluido 1:100 con solución diluyente durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Las placas fueron lavadas 4 veces con 350 µL de solución de lavado por pozo. Se adicionó el anticuerpo secundario (Anti - IgM humano conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:40.000 y se incubó por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Las placas fueron lavadas cuatro veces y luego se adicionaron 100 µl por pozo de solución substrato pNPP (Para-nitrofenilfosfato) incluyendo las celdas control y se incubó a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda. Finalmente, la reacción fue suspendida con la solución de hidróxido de sodio 1,2 N. La absorbancia se llevó a cabo en un instrumento Robonik® Readweell, equipado con filtros de 405 y 620 nm.: < 15 UI/mL fueron considerados negativos, entre 15 y 20 UI/mL indeterminado y > 20 UI/mL positivo.

Serotipificación

La identificación de los serovares circulantes se realizó mediante la prueba de Microaglutinación (MAT) en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Se usó un panel de dieciséis serovariedades de *Leptospira* spp. así: *serovares Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Bratislava, Hardjo prajitno, Hardjo bovis, Hebdomadis, Sejroe, Wolffii, Copenhageni, Ballum, Tarassovi, Autumnalis, Panama y Cynoptery*. Se consideró seropositividad para *Leptospira* spp. cuando las muestras tuvieron títulos iguales o superiores a 1:100 según lo establecido por la OMS [17].

Encuesta epidemiológica

Se ejecutó una encuesta epidemiológica que comprendía 36 preguntas, con el fin de obtener información sobre sintomatología clínica, variables demográficas, potenciales factores de riesgos y prácticas de bioseguridad. Los resultados fueron analizados

mediante estadística descriptiva y tablas de contingencia de 2x2. La asociación entre la positividad a *Leptospira* y las variables epidemiológicas se evaluó a través de la prueba de X², mientras que la fuerza de dicha asociación se determinó a través de la razón cruzada (OR), usando el programa SPSS *Statistic Data Editor*. Se usó un nivel de confianza del 95% y un $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

Evaluación de la vigilancia epidemiológica

Se llevó a cabo una evaluación normativa que permitió realizar un juzgamiento sobre los componentes de una intervención o programa en relación con las normas y/o criterios. Este tipo de evaluación se fundamenta en la relación que existe entre las normas establecidas para el funcionamiento de una intervención o programa y los efectos de los resultados de dicha intervención [18, 19].

Los criterios utilizados para la evaluación fueron seleccionados a partir de las directrices establecidas para la vigilancia de leptospirosis en Colombia, publicadas por el Instituto Nacional de Salud y el Ministerio de Salud y Protección Social [20]. La validez de la evaluación normativa se basa en la pertinencia de los instrumentos utilizados para evaluar una intervención [18]. La matriz diseñada fue evaluada en relación con su pertinencia y aplicabilidad, mediante un panel de profesionales en zoonosis de la Secretaría de Salud del Tolima, Universidad del Tolima y el Instituto Nacional de Salud convocada por el Consejo Técnico Seccional para la Vigilancia y Control de las Zoonosis de dicho departamento del país. Los criterios fueron presentados y discutidos en el panel, las conclusiones fueron incorporadas para estructurar la matriz final. La matriz de la evaluación quedó compuesta por 6 criterios fundamentales, que abordaron las siguientes temáticas: a) conocimiento sobre el flujo de la notificación de la leptospirosis; b) capacitaciones sobre el diagnóstico, tratamientos, seguimiento y reporte de la leptospirosis a los profesionales de la salud; c) investigación de casos o de brotes; d) análisis de la situación de la leptospirosis; e) uso de la información para toma de decisiones; f) actividades de promoción, prevención y control.

La información se colectó a través de una encuesta semiestructurada, que fue aplicada a los responsables de la vigilancia epidemiológica en cada municipio. Las encuestas fueron codificadas, los resultados fueron sistematizados a través del aplicativo Microsoft Excel®, el análisis se realizó en relación con el cumplimiento de los criterios, las preguntas abiertas fueron analizadas mediante el análisis de contenido [21] para caracterizar mejor las acciones de la vigilancia, reforzando la validez de las preguntas cerradas. Este estudio fue concebido por el Consejo Técnico Seccional para la Vigilancia y Control de las Zoonosis en el Tolima, como una primera aproximación al diagnóstico y vigilancia epidemiológica

de la leptospirosis, que permita establecer un plan de acción para prevenir la ocurrencia de esta enfermedad en el departamento.

Consideraciones éticas

El protocolo de investigación de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Secretaría de Salud del Tolima. Se obtuvo el consentimiento informado de las personas que participaron en el estudio y se garantizó la confiabilidad de los datos. Los resultados positivos permitieron que los individuos involucrados fueran contactados e informados del resultado de la prueba y la necesidad de implementar un tratamiento, así como las acciones de prevención y promoción en salud.

Resultados

La caracterización demográfica de los participantes mostró que el 78,54% de los participantes fueron hombres y el 21,46% mujeres, la mayoría residían en la zona urbana (88,51%), mientras que el 11,49% en la zona rural (Tabla 1). Se observó que el 37,93% tenía estudios de educación básica primaria, el 47,89%, educación secundaria, el 6,90% formación técnica o tecnológica y el 5,36% fueron profesionales universitarios. La población según las actividades de riesgo se distribuyó de la siguiente manera: 73 (28%) trabajadores en plantas de beneficio animal, 107 (41%) en recolección de residuos sólidos y 81 (31%) en alcantarillado y acueducto.

Tabla 1. Características demográficas de la población en estudio

| Características | Variables | Total |
|------------------|---------------------------------|-------|
| Género | Femenino | 56 |
| | Masculino | 205 |
| Zona | Rural | 30 |
| | Urbano | 231 |
| Nivel de estudio | Sin estudios | 5 |
| | Primaria | 99 |
| | Secundaria | 125 |
| | Técnico o Tecnológico | 18 |
| | Universitario | 14 |
| Oficio | Alcantarillado y Acueducto | 81 |
| | Recolección de Residuos Sólidos | 101 |
| | Plantas de Beneficio Animal | 73 |

Fuente: Encuesta epidemiológica de la investigación. Cálculo: los autores.

El porcentaje de personas con presencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp. fue de 25,29% (66/261). Todos los municipios del estudio (Figura 1) presentaron individuos seropositivos a *Leptospira* spp., el municipio del Líbano presentó el porcentaje más alto de seropositividad con 36,96%, seguido de Espinal y el Guamo con 28,57% cada uno, entre tanto los municipios con menor seropositividad fueron Lérida con 15,00% y Saldaña con 6,67%. Considerando el tipo de actividad laboral, se observó una mayor seropositividad en los trabajadores de la planta de beneficio animal con un 34,2%, seguido de aquellos individuos dedicados a la recolección de residuos sólidos con 27,10% y alcantarillado y acueducto con 14,8%.

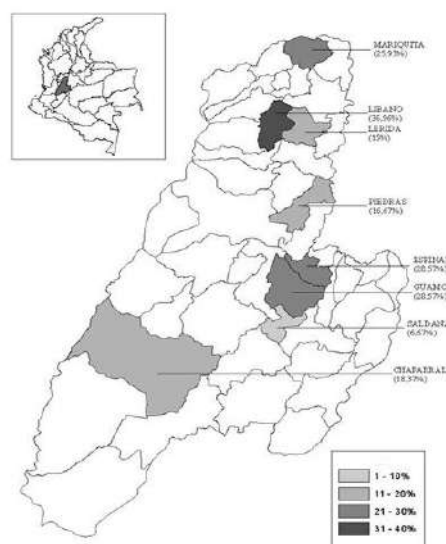


Figura 1. Frecuencia de personas con títulos IgM ≥ 100 contra *Leptospira* spp en 8 municipios del Tolima

Fuente: Test ELISA. Cálculo: los autores.

Un total de 55 muestras positivas a anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp. mediante ELISA, fueron sometidas a la prueba MAT. Esta indicó que 23 muestras (23/55) fueron positivas a algún serovar de *Leptospira*, se identificaron 6 serovares diferentes, y conglutinaciones en el 21,73% (5) de los sueros. El serovar más prevalente fue *Bratislava* en 16 muestras, seguido de *Ballum* (5), *Tarassovi* (3), *Icterhemorragiae* (1), *Hebdomadis* (2) y *Sejroe* (2). La mayoría de los serovares (*Bratislava*, *Ballum*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Icterhemorragiae*) fueron identificados en los tres grupos de riesgo, con excepción del serovar *Sejroe* que no estuvo presente en el personal de las plantas de beneficio, los serovares *Tarassovi* e *Icterohaemorrhagiae* en los grupos de recolección de

residuos sólidos y *Icterohaemorrhagiae* en el grupo de trabajadores en alcantarillado y acueducto (Tabla 2). En la Tabla 3 se resume la distribución de sueros positivos en el test de aglutinación microscópica (MAT), serovares reaccionantes, porcentajes de aglutinación y título alcanzado.

El análisis de asociación indicó que la actividad en plantas de beneficio animal fue el único factor de riesgo consistente (OR= 1,86; IC 1.02-3,38), con una probabilidad de casi dos veces de presentar anticuerpos IgM anti-*Leptospira* en este grupo de trabajadores,

mientras que las variables localización en zona rural y la presencia de animales de granja en el domicilio, aunque presentaron *odds ratios* relativamente altos (2,17 y 1,69, respectivamente), el intervalo de confianza incluyó el valor 1 (indiferente), indicando que la fuerza de dicha asociación es aun débil (Tabla 4). La actividad laboral en empresas de alcantarillado y acueducto, aparentemente se encontró como un factor protector para la presencia de anticuerpos IgM contra *Leptospira*; no obstante, este resultado podría deberse al bajo número de muestras analizadas.

Tabla 2. Serovares de *Leptospira* circulantes en grupos de trabajadores públicos en algunos municipios del Tolima según exposición

| Municipios | Serovares | | | | | |
|---------------------------------|------------|--------|-----------|------------|--------|------------------|
| | Bratislava | Ballum | Tarassovi | Hebdomadis | Sejroe | Icterhemorragiae |
| Alcantarillado y acueducto | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| Recolección de residuos sólidos | 7 | 1 | | 1 | 1 | |
| Plantas de beneficio animal | 8 | 3 | 2 | 1 | | 1 |
| Total | 16 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 |

Fuente: Test ELISA y MAT. Cálculo: los autores

Tabla 3. Distribución de sueros positivos a leptospirosis en el test de aglutinación microscópica (MAT)

| Serovar | Títulos de Aglutinación del Suero | | |
|------------------------|-----------------------------------|-------|------|
| | 1:100 | 1:200 | % |
| Bratislava (A) | 10 | 6 | 55,2 |
| Ballum (S) | 3 | 2 | 17,2 |
| Hebdomadis (D) | 2 | - | 6,9 |
| Icterhaemorrhagiae (F) | 1 | - | 3,4 |
| Tarassovi (G) | 2 | 1 | 10,3 |
| Sejroe (K) | 2 | - | 6,9 |
| Coaglutinaciones | | | |
| SF | 1 | - | |
| SF | 1 | - | |
| DK | 1 | - | 21,7 |
| AF | 1 | - | |
| ASG | 1 | 2 | |
| Porcentaje (%) | 68,96 | 31,03 | |

Fuente: Test ELISA y MAT. Cálculo: los autores

Tabla 4. Factores de riesgo para leptospirosis en la población ocupacional en municipios del Tolima

| Factores de Riesgo | X ² | P | Odd Ratio | Intervalo de confianza |
|--------------------------------|----------------|----------|-----------|------------------------|
| Pantas de beneficio animal. | 4,3 | 0,01899 | 1,86 | 1,02 - 3,38 |
| Zona rural. | 3,8 | 0,02438 | 2,17 | 0,96 - 4,81 |
| Animales de granja en la casa. | 2,8 | 0,0458 | 1,69 | 0,90 - 3,15 |
| <i>Factor de Protección</i> | | | | |
| Alcantarillado y Acueducto | 8,8 | 0,002512 | 0,40 | 0,19 - 0,79 |

Fuente: Test ELISA y MAT. Cálculo: los autores

Evaluación de la vigilancia epidemiológica

La evaluación de la vigilancia epidemiológica de leptospirosis indicó que el 37,5% de los coordinadores de salud pública entrevistados tenían estudios técnicos, 37,5% profesionales y el 25% estudios de posgrado. Los coordinadores tuvieron formación en auxiliar de enfermería, auxiliar de información, auxiliar de salud pública, enfermería, trabajo social, psicología y administración de empresas. El flujo de notificación de la leptospirosis fue conocido por los ocho coordinadores; sin embargo, solo cuatro aseguraron realizar todos los procedimientos en caso de presentarse una persona con esta enfermedad, tales como el envío oportuno de la investigación de campo, historia clínica completa, certificado de defunción y unidad de análisis con las entidades involucradas en la atención del paciente.

Las actividades de capacitación de los profesionales de la salud sobre el diagnóstico, tratamiento, notificación y seguimiento de los casos de leptospirosis, son aparentemente limitadas y solo dos secretarías mencionaron realizarlas. Las demás secretarías mencionaron no llevar a cabo capacitaciones por: a) ausencia de casos en los municipios; b) falta de interés y tiempo de los profesionales de los hospitales, como se muestra en los siguientes comentarios.

“[...] porque en el municipio han sido muy aislados los casos (MS65)”, “[...] por falta de casos y tiempo para hacer las capacitaciones (MS83)” “[...] por falta de interés, por parte del personal médico, además falta de tiempo (MS53)”.

En cuanto a las actividades de investigación de casos o de brotes, solo dos secretarías mencionaron realizar estas actividades. Las secretarías mencionaron realizar investigaciones mediante acciones intersectoriales, vinculando entidades como el Instituto Colombiano Agropecuario, empresas de abastecimiento, Secretaría de Salud del Tolima, entidades prestadoras de salud, y el Laboratorio Departamental. Las secretarías que no realizaron investigación afirmaron desconocer el protocolo para llevar a cabo el procedimiento, asimismo por no contar con recursos para efectuar dichas actividades y por escasos de casos registrados para hacer investigaciones. También se menciona que en

algunos reportes, aunque son remitidos oportunamente, no se obtuvo una retroalimentación o retorno de la información.

“[...] no conozco el conducto a realizar (MS65)”, “[...] no es frecuente, no existen recursos para adelantar este tipo de investigaciones (MS74)”, “[...] generalmente los pacientes son remitidos a Ibagué, faltando la notificación de los casos remitidos (MS59)”.

Entre los entrevistados, tres mencionaron realizar el análisis de la situación real del evento y la identificación de posibles factores asociados a leptospirosis. Las secretarías que no realizan análisis, indicaron que las investigaciones se centran en eventos de alta notificación o, por otro lado, lo atribuyen al tiempo insuficiente para ejecutar las labores. Las secretarías que realizan dicho procedimiento manifestaron promover discusiones sobre el análisis de la enfermedad en el Comité de Vigilancia Epidemiológica (COVE). Todas las secretarías analizan y usan apropiadamente las informaciones de la vigilancia para la toma de decisiones que afecten o puedan afectar la salud de la población en la localidad; sin embargo, no proporcionaron alguna evidencia al respecto. En cuanto a las acciones de prevención y control, seis de los participantes realizaban actividades para la promoción de hábitos saludables, siete para mejorar las condiciones higiénicas sanitarias de la localidad, cinco promueven la tenencia responsable y adecuada de las mascotas y seis la necesidad de solicitar una consulta oportuna. Las secretarías que no realizan actividades de promoción, prevención y control mencionan la falta de tiempo y de personal.

Discusión

Este estudio estableció por primera vez una aproximación a la epidemiología de la leptospirosis, los resultados muestran una alta seroprevalencia de *Leptospira* spp. (25,29%) en la población de riesgo laboral de 8 municipios del Tolima, con mayor presencia en grupo de trabajadores de la plantas de beneficio animal (34,2%) y recolección de residuos sólidos (27,10%). Estudios semejantes en países tropicales han mostrado altas tasas de prevalencia; por ejemplo, un estudio en el personal de aseo en Brasil mostró mayores tasas de prevalencia

en trabajadores de limpieza pública con 46,7% en comparación a trabajadores de agua y alcantarillado con 24,1% [22]. En la capital de Uruguay se detectaron prevalencias del 8,6% en trabajadores de aseo urbano [23]. Específicamente en trabajadores de matadero, un estudio en México en la región fronteriza con los Estados Unidos, encontró una prevalencia de 8,22% [24]. En Brasil la evaluación de diferentes patógenos en trabajadores de matadero, mostró una prevalencia del 4,0% para *Leptospira* spp., sin embargo, el análisis de riesgos evidenció que solo los casos de *Leptospira* spp. se debían a una infección ocupacional mostrando la relevancia de esta enfermedad [25].

La prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* spp., identificada en este estudio serológico es muy similar a la prevalencia (35%) establecida en trabajadores de plantas de beneficio animal de 5 municipios de Boyacá [26], y un poco superior a la prevalencia (19%) estimada en poblaciones de riesgo en Villavicencio [11]. Siendo más baja que la prevalencia de 75,8% establecida en una población de 62 trabajadores de granjas porcícolas en Montería, donde las condiciones tropicales de la región con alta humedad y al contacto permanente con cerdos y perros, podría favorecer aún más la contaminación [27]. En Manizales, un estudio que determinó la seroprevalencia de *Leptospira* spp. en operarios de la central de sacrificio con las pruebas de MAT e Inhibición de Crecimiento (IC) en tres muestreos, no identificó casos positivos de leptospirosis por MAT; sin embargo, con el uso de la prueba de IC en la segunda y tercera colecta, se obtuvieron prevalencias de 14,3% y 4% respectivamente [28]. Las diferencias en la seroprevalencia estimada en este estudio y aquellas reportadas en otras ciudades del país como Manizales y Villavicencio pueden estar relacionadas con las medidas de prevención y protección implementadas por los trabajadores, y posiblemente resalta deficiencias en las condiciones sanitarias en las plantas de beneficio de municipios pequeños, donde puede presentarse un mayor riesgo de contaminación.

La detección de *Leptospira* spp. se realizó mediante la prueba de ELISA debido a que esta técnica es sencilla y fácil de ejecutar en condiciones de infraestructura mínima y como una estrategia de tamizaje preliminar de bajo costo. Por otro lado, la complejidad de la prueba MAT requiere de un número considerable de serovares y su mantenimiento y la ausencia de laboratorios especializados en la región imposibilitan su uso de rutina y tamizaje [29-30]. Recientemente se están desarrollando estudios para la caracterización molecular de serotipos de aislamientos en Colombia, para establecer un panel diagnóstico más adecuado al contexto epidemiológico del país [31, 32]. La técnica de ELISA usada para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp. es un método convencional ampliamente usado en el diagnóstico de leptospirosis, por lo tanto, estudios

que compararon MAT y ELISA evidenciaron resultados semejantes en cuanto a su sensibilidad y especificidad [29, 30], siendo ELISA una prueba de referencia [16]. Los resultados de este estudio indican la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp, pero no confirman la infección y, por lo tanto, no constituye evidencia suficiente para emitir un diagnóstico de leptospirosis. Un alto porcentaje (41%) de casos identificados por ELISA fueron confirmados por MAT; sin embargo, se hace necesario implementar técnicas moleculares más sensibles como el PCR convencional y en tiempo real para precisar el diagnóstico.

Las ratas son reservorios primarios de especies de *Leptospira* spp., y un número de estudios han demostrado la transmisión de *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* de ratas a humanos [33]. Contrario a lo esperado y reportado en la literatura internacional, el grupo de trabajadores con actividad de recolección de residuos sólidos, que informó tener mayor contacto con roedores en descomposición, mostró asociación con el serovar *Icterohaemorrhagiae*. Estos resultados pueden deberse al bajo número de individuos analizados o posiblemente a una sobredimensión de la frecuencia de dichos eventos que estos reportaron al momento de la encuesta. Sin embargo, las prácticas de protección laboral deben realizarse para la prevención de leptospirosis. Los trabajadores de alcantarillado y acueducto mostraron una seroprevalencia de 14,8%, un poco baja frente a los demás grupos de riesgo, esto puede deberse a que se incluyeron trabajadores de acueducto de agua potable que operan en diferentes etapas del tratamiento y redes de distribución de agua para consumo humano. La transmisión de la leptospirosis a través del agua se ha relacionado principalmente con aguas no tratadas, además la *Leptospira* spp. es sensible a los procedimientos de cloración [34]. Los operarios de este estudio realizaban actividades de acueducto de agua potable como de mantenimiento del alcantarillado, debido al bajo número de personal en las empresas de los pequeños municipios, situación que puede incrementar el riesgo de transmisión de leptospirosis y otras enfermedades zoonóticas. Así, se hace necesario en futuras investigaciones, verificar el tiempo de permanencia de los operarios en cada una de dichas actividades y si eventualmente la necesidad de rotación influye en la transmisión de la enfermedad.

Los serovares de *Leptospira* spp. más frecuentes encontrados en este estudio fueron *Bratislava* (caballos), *tarassovi* (cerdos) y *ballum* (ratas), siendo baja la seropositividad para el serovar *icterohaemorrhagiae* (ratas), resultados semejantes se observaron en operarios de mataderos de los municipios de Boyacá, que identificaron altos porcentajes de seropositividad para *bratislava* en comparación con *icterohaemorrhagiae* [27]. En el estudio no fueron identificados los serovares *hardjo* (ovejas), *Pomona* (vacas), *canicola* (perros) y

grippytyphosa (mapaches y zarigüeyas); sin embargo, diferentes estudios en Colombia han referido estos serotipos en la región andina, en trabajadores de fincas porcinas y en el Urabá Antioqueño [10, 25, 35]. El análisis de las fichas de notificación en el Tolima, entre los años 2009 y 2011, reveló que los serovares más frecuentes en el departamento fueron *icterohaemorrhagiae*, *bratislava*, *grippytyphosa*, *canicola* y *hardjo*; no obstante, el análisis de seroprevalencia de *Leptospira* spp. en la zona urbana de municipios del Tolima, realizado por Romero y cols. [36] en poblaciones humana y canina, mostró una reducción en la prevalencia de los serovares *pomona* y *grippytyphosa* y un aumento en la frecuencia de los serovares *icterohaemorrhagiae* y *canicola*, indicando un cambio en la presentación de la enfermedad en la población urbana. Los resultados demuestran también la amplia variedad de serovares circulantes en el Tolima y la importancia de los reservorios, siendo necesario evaluar la presencia de dicha enfermedad en animales domésticos.

El conocimiento de los serovares más prevalentes o circulantes en una región puede ayudar a identificar las posibles fuentes de infección y los reservorios. Al considerar los serovares que presentaron mayor frecuencia en este estudio, se encontró que los posibles hospederos de mantenimiento son los porcinos hospederos de *Bratislava* y *Tarassovi* y los roedores hospedero del serovar *ballum* [3]. La presencia de estos serovares en cerdos y roedores puede estar relacionado con la cultura de crianza de animales a traspatios, principalmente de porcinos, práctica usual en el departamento tanto en la zona urbana como rural, la cual podría aumentar la circulación de la *Leptospira* y el contacto con los roedores y humanos. En Colombia, la seroprevalencia de *Leptospira* en porcinos fluctúa entre 22,8% y 55,9% [25, 37] y se identifica presencia de roedores en planteles porcícolos [38]. En roedores se ha reportado seropositividad del 25,2% [33]. Cabe resaltar que el número de serovariedades analizadas en dichos estudios fue reducido, en algunos no fueron consideradas las serovariedades *Tarassovi* y *Ballum*, las cuales presentaron mayor frecuencia en este estudio. Los resultados indican la importancia del control de la *Leptospira* en porcinos y en roedores, por tanto las estrategias de prevención de la leptospirosis deben vincular diferentes sectores como la industria pecuaria, las organizaciones de salud y sanidad, las organizaciones de protección ambiental y aquellas involucradas con la salud pública.

Este estudio reveló una alta vulnerabilidad del sistema de vigilancia epidemiológica para leptospirosis en el Tolima, situación que debe ser tenida en cuenta por las entidades gubernamentales y que permita tomar acciones sobre la necesidad de capacitación y dotación en infraestructura mínima para la notificación e investigación apropiada. Es preciso mencionar

que en 6 municipios no se realiza la capacitación a los profesionales de la salud por desinterés y tiempo insuficiente para las actividades de los profesionales de salud. El desconocimiento de los profesionales de la salud es una limitante muy importante para el diagnóstico microbiológico y manejo apropiado de la leptospirosis, dadas las similitudes de las manifestaciones clínicas con las de otras patologías infecciosas. Una encuesta sobre conocimientos en *Leptospira* spp realizada a estudiantes de Medicina Veterinaria sugiere que existe una formación académica sólida en transmisión de la enfermedad; sin embargo, resaltan deficiencias en la etiología, prevención y diagnóstico [39]. Es necesario evaluar las competencias para el abordaje de esta enfermedad en los diferentes profesionales de salud y desarrollar estrategias para promover la formación de recursos humanos.

En Colombia y en particular en el departamento del Tolima la investigación epidemiológica y el diagnóstico de la leptospirosis es muy limitada. Las razones principales son la falta de compromiso gubernamental con la salud, y reducida disponibilidad de recursos físicos y económicos. Una evaluación del sistema de vigilancia en salud pública en Colombia, realizado por López [40], evidencia las debilidades de los territorios para ejercer la vigilancia en salud pública debido a la ineficaz regulación, ineficiente financiamiento y control del sistema de vigilancia, que pueden comprometer el funcionamiento y reporte de los datos de salud. En consecuencia, el fortalecimiento de la vigilancia de la leptospirosis dependerá en gran medida de las capacidades de los territorios para desarrollar de forma autónoma las acciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Técnico Seccional para la Vigilancia y Control de las Zoonosis en el Tolima y a las instituciones que la conforman, por el apoyo financiero y logístico para la ejecución del estudio. A los trabajadores y profesionales adscritos a las empresas públicas involucradas en la investigación.

Referencias

- 1 Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect* 2013; 43 (1): 1-9.
- 2 Bharti AR, Nally J, Ricaldi JN, Mathias M, Díaz MM, Lovett MA. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (12): 757-71.
- 3 Hartskeerl RAM, Collares-Pereira, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4): 494-501.
- 4 Ullmann LS, Langoni H. Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2011; 17 (2): 119-129.

- 5 Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 2008; 12 (4): 351-357.
- 6 Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica* 2006; 26 (2): 250-257.
- 7 Cann KF, Thomas DR, Salmon RL, Wyn-Jones AP, Kay D. Systematic Review. Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol Infect* 2013; 141 (4): 671-686.
- 8 Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, Rodas JD. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no palúdico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomédica* 2013; 33 (1) 99-107.
- 9 Jaramillo L, Arboleda M, García V, Agudelo-Flórez, P. Coinfección brucelosis-leptospirosis, Urabá, Colombia. Reporte de caso. *Infectio* 2014; 18 (2): 72-76.
- 10 Agudelo PF, Restrepo BNJ, Arboleda MN. Situación de la Leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. *Cad de Saúde Pública* 2007; 23 (9): 2094-2102.
- 11 Góngora A, Parra J, Aponte LH, Gómez LA. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en grupos de población de Villavicencio, Colombia. *Rev Salud Pública* 2008; 10 (2): 269-278.
- 12 Escobar DF, García WF, Sandoval LA, Tibaquirá LE, Grisales H. Epidemiología de la leptospirosis en el departamento del Tolima, Colombia, 2009-2011. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2013; 31 (1): 48-57.
- 13 Abela Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. *International Journal Antimicrobial Agents* 2010; 36 (1): S5-S7.
- 14 Costa F, Martínez-Silveira MS, Hagan JE, Hartskeerl RA, Reis MGD, Ko AI. Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996-2005: a review of data from ministries of health. *Rev Panam Salud Pública* 2012; 32 (3): 169-177.
- 15 Bello S, Rodríguez M, Rodríguez F, Paredes A, Realpe M, Mendivelso F. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. *Biomédica* 2013; 33 (1): 153-60.
- 16 Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Lotero MA. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Biomédica* 2006; 26 (2), 216-23.
- 17 World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization. 2008.
- 18 Champagne F, Hartz Z, Brousselle A, Contandriopoulos AP. A apresiacao normativa. En *Avaliação: conceitos e métodos*. Brousselle A, Champagne F, Contandriopoulos AP, Hartz Z. *Avaliação: conceitos e métodos*. Fiocruz. Rio Janeiro: Editora Fiocruz, 2011, pp. 29-48.
- 19 Donabedian A. Una aproximación a la monitorización de la calidad asistencial (primera parte). *Rev Calid Asist* 1991; 6 (1): 1-6.
- 20 Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública para leptospirosis. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2010.
- 21 Bardin, L. Análisis de contenido. Madrid: Ediciones Akal, 1991.
- 22 Vasconcelos LM, Cisalpino EO, Vieira MNR, Koury MC. Pesquisa de aglutininas antileptospira em diferentes grupos profissionais na cidade de Londrina, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25 (4): 251-255.
- 23 López F, Samudio M, de Assis DM, Cabello Á. Seroprevalencia de leptospirosis y factores asociados en trabajadores del servicio de aseo urbano de la Municipalidad de Asunción, Paraguay. *Rev Chil Infect* 2015; 32 (6): 628-633.
- 24 Rodríguez-Parra ME, Bocanegra-Alonso A, Casar-Solares A, Acosta-González RI, Cruz-Hernández NI, Flores-Gutiérrez GH. Epidemiological patterns of *Leptospira interrogans* among slaughterhouse workers from the Eastern United States-Mexico border region. *Afric J Microbiol Res* 2012; 6 (7): 1584-1590.
- 25 Gonçalves DD, Teles PS, Reis CRD, Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT, Freitas JCD. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48 (3): 135-140.
- 26 Pedraza MA, Salamanca EE, Ramírez YR, Ospina MJ, Pulido OM. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en trabajadores de plantas de sacrificio animal en Boyacá, Colombia. *Infectio* 2012; 16 (1): 30-36.
- 27 Calderón A, Rodríguez V, Máttar 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.
- 28 Orrego AU, Giraldo G, Ríos BA, Valencia PAP. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la Central de Sacrificio de Manizales, Colombia. *Arch. Med. Vet* 2003; 35 (2): 205-213
- 29 Niloofa R, Fernando N, de Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, et al. Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. *PloS one* 2015; 10 (6): e0129236.
- 30 Bajan MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 2003; 41 (2): 803-9.
- 31 Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Máttar S, et al. Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomédica* 2013; 33 (1): 179-184.
- 32 Romero-Vivas CM, Cuello-Pérez M, Agudelo-Flórez P, Thiry D, Levett PN, Falconar AK. Cross-sectional study of *Leptospira* seroprevalence in humans, rats, mice, and dogs in a main tropical sea-port city. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 88 (1): 178-183.
- 33 Agudelo-Flórez P, Arango JC, Merizalde E, Londoño AF, Quiroz VH, Rodas JD. Evidencia serológica de circulación de *Leptospira* spp en *Rattus norvegicus* naturalmente expuestos en una zona urbana colombiana. *Rev Salud Pública* 2010; 12 (6): 990-999.
- 34 World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2011.
- 35 Ochoa JE, Sánchez A, Ruíz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Pública* 2000; 7 (5): 325-331.
- 36 Romero MH, Sánchez JA, Hayek LC. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. *Rev Salud Pública* 2010; (12) 2: 268-275.
- 37 Almenteros C, Arrieta G, Máttar S, Barguil A, Tamayo L, Padilla T, et al. Seroprevalencia de leptospirosis porcina en el departamento de Córdoba. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2004; 17 (2): 141-147.
- 38 Giraldo GL, Orrego AU, Betancurth AM. Los roedores como reservorios de *Leptospiras* en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia. *Arc Med Vet* 202; 34 (1): 69-78.

- 39 Crisnacho-Torres DS, Benítez-Cabrera KA, Góngora-Orjuela A. Conocimientos sobre leptospirosis en estudiantes de veterinaria y seropositividad, Villavicencio, 2011. Orinoquia 2012; 16 (2): 118-124.
- 40 López YL, González C, Gallego BN, Moreno AL. Rectoría de la vigilancia en salud pública en el sistema de seguridad social en salud de Colombia: estudio de casos. Biomédica 2009; 29 (4):567-581.