



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA ENROFLOXACINA  
CLORHIDRATO-DIHIDRATO (ENRO-C) EN EL TRATAMIENTO DE  
LEPTOSPIROSIS EN VACAS**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**ARANDA ESTRADA MELISSA**

**Asesores:**

MVZ Corazón de Jesús Mendoza Bautista  
MVZ MPA Miguel Ángel Quiroz Martínez

Ciudad Universitaria, Cd.Mx.

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mi mamá y abuela (q.e.p.d) que me dieron enseñanzas y cariño incondicional para forjar el ser que soy; a mi mami que ha sido mi mayor ejemplo como mujer profesionalista y exitosa que es, a mi padre, abuelo, tías, Beto que siempre creyeron en mí y me dieron su apoyo incondicional. Y a todos los seres queridos que me rodean y me han motivado en mi autorealización.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios, tu amor y bondad no tiene fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son el resultado de tu ayuda.

Agradezco a mi familia y a todas las personas especiales en mi vida, que estuvieron conmigo aún en los momentos más difíciles, y que me otorgaron su confianza.

A todos mis profesores, doctores y asesores gracias por transmitirme sus conocimientos, otorgarme su dedicación y esfuerzo y, por ayudarme en mi formación profesional, para llegar al punto en el que hoy me encuentro; nada de esto es posible sin ustedes.

Gracias a todos los doctores y encargados de los establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hgo., que me permitieron desarrollar mi tesis en el campo de trabajo.



|      |   |    |
|------|---|----|
| II.  | Hipótesis   | 26 |
| III. | Objetivos.....  | 26 |
|      | 3.1 Objetivo general.....   | 26 |
|      | 3.2 Objetivos específicos.....  | 26 |
| IV.  | Material y métodos.....   | 27 |
|      | 4.1 Localización del área de estudio.....   | 27 |
|      | 4.2 Población animal y criterios de inclusión.....  | 28 |
|      | 4.2.1 Titulación de anticuerpos.....  | 30 |
|      | 4.3 Tratamiento antibacteriano.....   | 30 |
|      | 4.4 Análisis estadístico.....   | 31 |
| V.   | Resultados.....   | 32 |
|      | 5.1 Diagnóstico de leptospirosis<br>bovina.....   | 32 |
|      | 5.2 Resolución de parámetros reproductivos después del<br>tratamiento con Enro-C.....   | 34 |
|      | 5.3 Casos positivos a serovariedades de <i>Leptospira</i> sp y<br>disminución de anticuerpos antileptospirales después del<br>tratamiento con Enro-C..... | 35 |
| VI.  | Discusión.....  | 39 |
| VII. | Referencias.....  | 42 |

#### Figuras

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Inundación en Cuenca lechera de Tizayuca (A).<br>Encharcamiento y manejo de excretas deficiente en corrales<br>(B).....          | 28 |
| 4.2 Presencia de perros y ratas que actúan como reservorios<br>de <i>Leptospira</i> spp.....   | 28 |
| 5.1 Signos clínicos asociados a leptospirosis observados<br>durante el diagnóstico clínico en vacas lecheras.....                    | 32 |
| 5.2 Aborto (A) y momificaciones (B) de vacas positivas<br>serológicamente a <i>Leptospira</i> spp.....                               | 33 |
| 5.3 Becerros nacidos débiles de vacas positivas<br>serológicamente a <i>Leptospira</i> spp.....                                      | 34 |
| 5.4 Retención placentaria de vacas positivas serológicamente<br>a <i>Leptospira</i> spp.....   | 34 |
| 5.5 Proporción de las serovariedades diagnosticadas mediante<br>MAT, de muestras de suero de vacas con leptospirosis<br>crónica..... | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 5.6 Número de animales positivos a serovariedades probadas, antes y después del tratamiento con Enro-C..... | 37 |
|---|----|

Cuadros

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Clasificación del género <i>Leptospira</i> de 20 especies descritas.....                                     | 3  |
| 1.2 Frecuencia de seropositividad a leptospirosis bovina en México.....  | 6  |
| 4.1 Calificación de diagnóstico con base en el nivel de riesgo.....  | 30 |
| 5.1 Parámetros reproductivos después del tratamiento con Enro-C.....   | 35 |
| 5.2 Promedio de títulos de anticuerpos antileptospira antes y 28-35 días después del tratamiento con Enro-C..... | 38 |

## RESUMEN

ARANDA ESTRADA MELISSA. Evaluación de la eficacia de la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (Enro-C) en el tratamiento de leptospirosis en vacas (bajo la dirección de MVZ, Corazón de Jesús Mendoza Bautista y MVZ MPA, Miguel Ángel Quiroz Martínez)

La leptospirosis bovina es una enfermedad reemergente causante de pérdidas productivas y reproductivas lo que representa una carga financiera significativa en las producciones lecheras. Para ayudar en el control de esta enfermedad se evaluó la eficacia del tratamiento Enro-C. En este estudio se utilizaron 56 vacas Holstein Friesian diagnosticadas de leptospirosis por medio de signos clínicos y la prueba de aglutinación microscópica (MAT); el 100% de las vacas resultaron serológicamente positivas a *Leptospira* spp. y el 89.3% fueron reactivas a más de una serovariedad, de las cuales las más frecuentes fueron Bratislava, Canicola, Hardjo y Pomona. En éstas, se estableció un tratamiento de hidrocloreuro de dihidrato de enrofloxacin (Enro-C) a dosis de 15 mg/kg administrado intramuscularmente cada 24 horas durante 5 días. Después de 28-35 días postratamiento los casos positivos a leptospira disminuyeron, en la prueba de MAT se redujeron en promedio los títulos de anticuerpos y fueron estadísticamente significativos. También se obtuvieron mejoras en parámetros reproductivos después del tratamiento con Enro-C que se consideran ideales para un establo, logrando el 100% de vacas gestantes al final del estudio. Se puede concluir que la Enro-C es una opción viable para tratar la leptospirosis en bovinos y reducir las pérdidas económicas.



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Leptospirosis bovina

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, causada por especies patógenas del género *Leptospira*, afecta a la mayoría de los mamíferos, incluido el ser humano, y desde el año 2011 la OMS la considera una zoonosis reemergente a nivel mundial (Hartskeerl et al., 2011).

La leptospirosis bovina constituye pérdidas económicas en unidades de producción de leche, las pérdidas son principalmente reproductivas, debidas a infertilidad, abortos, nacimiento de becerros débiles y mortinatos que causan una disminución en la eficiencia reproductiva, altas tasas de sacrificio, mastitis clínica y la disminución de la producción de leche (Atxaerandio et al., 2005).

El aborto en el segundo y tercer tercio de gestación representa una de las causas principales de pérdidas económicas en los establos lecheros. Si bien no hay estimaciones oficiales, el efecto del aborto tiene un costo aproximado de \$200 millones de dólares al año solo en California (Hanson et al., 2003), lo que nos da una idea de la pérdida causada por la enfermedad, que representa una gran cifra para la economía del establo sumándole las pérdidas por disminución de la producción de leche y la eliminación prematura de los animales.

## 1.2 Etiología

Las leptospiras son bacterias helicoidales de aproximadamente 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 6 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud, que tienen extremos enganchados propios (Adler y Peña-Moctezuma, 2010). El género *Leptospira*, familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales* incluye 20 especies y se han descrito más de 300 serovariedades, agrupadas en 20 serogrupos. La estructura del lipopolisacárido (LPS) es el principal determinante de la serovariedad (Adler y Peña Moctezuma, 2010). Las leptospiras se clasifican en 3 grandes subgrupos (Cuadro 1.) basados en su filogenia, patogenicidad, virulencia y características de crecimiento *in vitro* (Lehmann et al., 2014). Existen seis especies saprófitas, nueve especies patógenas y cinco

especies llamadas “intermedias”, en las cuales la virulencia no se ha demostrado experimentalmente (Picardeau, 2013).

Cuadro 1.1 Clasificación del género *Leptospira* de 20 especies descritas

| Grupo I o especies patógenos | Grupo II o especies patógenos intermedios | Grupo III o especies saprófitas |
|------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>L. interrogans</i>        | <i>L. wolffi</i>                          | <i>L. wolbachii</i>             |
| <i>L. kirschneri</i>         | <i>L. licerasiae</i>                      | <i>L. meyeri</i>                |
| <i>L. noguchii</i>           | <i>L. inadai</i>                          | <i>L. biflexa</i>               |
| <i>L. borgpetersenii</i>     | <i>L. fainei</i>                          | <i>L. vanthielii</i>            |
| <i>L. weilii</i>             | <i>L. broomii</i>                         | <i>L. terpstrae</i>             |
| <i>L. santarosai</i>         |   | <i>L. yanagawae</i>             |
| <i>L. alexanderi</i>         |   |                                 |
| <i>L. alstonii</i>           |   |                                 |
| <i>L. kmetyi</i>             |   |                                 |

Adaptado de (Picardeau, 2013).

La leptospira se clasifica dentro de las bacterias Gram negativas debido a la estructura característica de éstas, con la diferencia que tiene una estructura típica de doble membrana, en la que la membrana citoplasmática y la pared celular del peptidoglucano están estrechamente asociadas y son superpuestas por una membrana externa. Posee dos endoflagelos que surgen en cada extremo de la bacteria y se extienden a lo largo del espacio periplásmico, siendo responsables de la motilidad. Dentro de la membrana externa, el LPS constituye el principal antígeno; pero que comparado con el LPS de *E. coli*, es relativamente no tóxico para las células o los animales; éste LPS, está compuesto de lípido A, el cual contiene una unidad de disacárido de glucosamina modificada, fosforilada y metilada (Adler y Peña Moctezuma, 2010). Además del LPS, la membrana externa está compuesta por proteínas estructurales; una gran proporción de éstas son lipoproteínas, las que se encuentran en la parte interna: LipL32, LipL36 y OmpL1; y otras expuestas en la superficie, como

LipL21, LipL41 y LigB (Haake et al., 1998; Ko et al., 2009). Otras estructuras que han demostrado ser antigénicas se encuentran en la membrana externa, que incluyen a la secretina GspD del sistema de secreción de tipo dos (T2SS) (Adler y Peña Moctezuma, 2010).

*Leptospira* spp. son consideradas aerobias obligadas con una temperatura de crecimiento de 28-30°C, con pH óptimo de 7.2-7.6. Sus fuentes de energía y carbono son mediante beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga, necesaria para su crecimiento. La albúmina de suero de bovino, el ácido oleico y el polisorbato (Tween®), son utilizados como desintoxicantes de algunos ácidos grasos (Adler y Peña Moctezuma, 2010). Los iones de amonio como fuentes de nitrógeno son administrados en forma de sales de amonio o mediante la desaminación de aminoácidos; algunas formas de leptospiras producen una ureasa que permite la sustitución de amoniaco por urea. La adición de suplementos nutricionales requeridos incluye tiamina, biotina, fosfato, calcio, magnesio y hierro; y compuestos adicionales que se agregan en condiciones *in vitro* de cepas patógenas como cobre, manganeso y sulfato. Estas y otras características le confieren la capacidad para sobrevivir de manera libre en el medio ambiente combinado con una adaptación genética (Guerrero et al., 2001; Cameron, 2015).

Las tasas de crecimiento bacteriano *in vitro* varían según la especie que se cultiva, el grado de adaptación previa al crecimiento de laboratorio y el inóculo utilizado para iniciar el cultivo. El crecimiento de las leptospiras es lento en el aislamiento primario y los cultivos deben conservarse durante aproximadamente 13 semanas antes de ser descartados (Adler y Peña Moctezuma, 2010).

## **1.3 Epidemiología**

### **1.3.1 Leptospirosis humana**

La leptospirosis humana es una enfermedad infecto-contagiosa con frecuencia desatendida, endémica de regiones tropicales y subtropicales (Hartskeerl et al., 2011) y en regiones templadas, por lo que se considera de distribución mundial (Picardeau, 2013) con mayor grado de afectación en poblaciones marginadas de países en desarrollo (Ko et al., 2009). Los brotes de leptospirosis tienen una incidencia alta en temporadas de lluvias (Smith, 2010),

donde el calor y humedad favorecen su sobrevivencia bacteriana con posibilidad de infección al humano (Fávero et al., 2017). Recientemente la OMS (2011) refiere que factores como el aumento del calentamiento global y las precipitaciones pluviales, han favorecido un incremento en la incidencia de leptospirosis. La incidencia mundial en humanos es de 500 000 a 1 750 000 casos severos al año, una morbilidad de 1 030 000 casos y 58 900 muertes anuales, con tasa de letalidad global de 6.85% al 10% (Ko et al., 2009; Hartskeerl et al., 2011, Costa et al., 2015) y de 20% o más para la región de América Latina (Guerrero, et al., 2001).

### **1.3.2 Leptospiriosis bovina**

La leptospirosis bovina tiene una distribución mundial, las condiciones ambientales en áreas tropicales y subtropicales favorecen su presentación durante todo el año; en zonas templadas se presenta de forma estacional en los meses de altas temperaturas y lluvias, y en regiones áridas se manifiesta en sitios donde existe agua y una alta concentración animal (Martins y Lilienbaum, 2017).

La mortalidad es baja, aproximadamente del 5%, y la morbilidad suele ser elevada, de hasta el 100%. Uno de los principales factores de riesgo de tener un hato infectado, es la presencia de animales enfermos, quienes pueden cursar por una fase aguda con resolución de signos clínicos mediante tratamientos, pero con alta probabilidad de mantenerse como portadores, lo que representan un riesgo potencial de infección para la población animal y el personal expuesto (Fávero et al., 2017).

Los bovinos son considerados huésped de mantenimiento de las especies *interrogans* y *borgpetersenii*: serovariedad Hardjo tipo prajitno y serovariedad Harjo tipo harjobovis respectivamente (Carmona-Gasca et al., 2011; Fávero et al., 2017). La enfermedad también puede ser causada por otras serovariedades de la especie *interrogans*, incluidas: Pomona, Gryppotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Javanica, Tarassovi, Autumnalis, Australis, Hebdomadis, Canicola (Atxaerandio et al., 2005, Grooms 2006; Rinehart et al., 2012; Ellis, 2015; Fávero et al., 2017). El riesgo de infección por una o más serovariedades dependerá de la endemicidad de la región o país, y su presencia está muy

relacionada a diferentes factores como ambiental, zootécnico, cultural y social (Fávero et al., 2017).

La presencia de enfermedad y aislamiento de su agente causal en el ganado ha sido reportada en un gran número de países alrededor del mundo, incluyendo Nueva Zelanda, con aislamientos de *L. botgpetersenii* serovar Hardjo tipo hardjobovis y *L. interrogans* serovar Pomona (Fang, 2014). Regiones en Brasil con 3.2, 0.6 y 3.1% de prevalencia de serovariedades Pomona, Icterohaemorrhagiae y serogrupo Sejroe respectivamente; sin embargo otras regiones con hasta el 98.8% de prevalencia, donde las condiciones ambientales favorecen la presencia de *Leptospira* spp. (Fávero, 2017). En Reino Unido hasta un 10% de los abortos son atribuidos a leptospirosis (Costa et al., 2015).

En México, existen todas las variantes climáticas en sus cuatro regiones ecológico-ganaderas: árida y semiárida, trópico seco, trópico húmedo y zona templada; dichas regiones favorecen la presencia de la enfermedad en las cuales se han reportado seroprevalencias de leptospirosis en bovinos (ver Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Frecuencia de seropositividad a leptospirosis bovina en México

| Región ecológica  | Seropositivos (%) | Serovariedades prevalentes   |
|-------------------|-------------------|--|
| Árida y semiárida | 37.8 (31-59)      | Cepa H-89 (Hardjo genotipo hardjoprajitno†), Hardjo, Wolffi y Tarassovi  |
| Tropical seca     | 45.9 (27-72)      | Wolffi, Hardjo y Tarassovi   |
| Tropical húmeda   | 63.8 (31.7-84.6)  | Cepa H-89, Hardjo, Wolffi y Tarassovi  |
| Templada          | 39.4 (22-66)      | Icterohaemorrhagiae (Palo Alto†), portlandvere (cepa Sinaloa ACR†), Bratislava, Pyrogenes, Pomona, cepa H-89, Hardjo, Wolffi y Tarassovi |
| Total             | 51.3              |  |

†Aislamientos

Adaptado de Luna et al., 2005

### **1.3.3 Hospedadores y reservorios**

La leptospirosis posee un gran espectro de hospedadores mamíferos, incluyendo los bovinos (Pinto et al., 2016). Los animales infectados se convierten en hospedadores de mantenimiento o reservorios al albergar y excretar a la bacteria de los túbulos renales durante largos periodos, incluso durante toda su vida, al medio a través de la orina, ya sea de forma intermitente o continua (Adler y Peña Moctezuma, 2010; Costa et al., 2015) donde pueden sobrevivir durante semanas en el agua o suelo (Meri, et al., 2005). Los roedores son los principales reservorios debido a la capacidad de mantenerse infectados sin causarles la muerte aún con serovariedades altamente virulentas (Hartskeerl et al., 2011).

Las serovariedades suelen estar asociadas a un reservorio animal específico, por ejemplo, en ratas suele ser serovariedad *Icterohaemorrhagiae* mientras que la serovariedad *Canicola* está asociada a perros (Picardeau, 2013), Bratislava en caballos y cerdos, Australis y Pomona en cerdos (Adler y Peña-Moctezuma, 2010) y *L. borgpetersenii* serovar Hardjo tipo hardjobovis y *L. interrogans* serovar Hardjo tipo hardjoprajitno en bovinos (Pinto et al., 2016).

### **1.3.4 Fuentes de infección**

La infección se produce por contacto directo con la orina, sangre, leche, fluidos placentarios o tejidos de los animales infectados, por contacto indirecto al exponerse al medio ambiente contaminado, así como por transmisión venérea y transplacentaria (Mughini-Gras et al., 2014). Algunas serovariedades, como Hardjo, pueden persistir en el tracto reproductivo, lo que puede conducir a una transmisión venérea (Alt et al., 2001).

Algunos factores de riesgo asociados a la afección son, el acceso a agua encharcada, presencia de otros animales reservorios en el área, entre ellos roedores, perros y animales silvestres, que contaminan al agua de bebida y alimento (Fávero et al., 2017).

## **1.4 Patogenia**

Las leptospiras penetran el organismo a través de lesiones en la piel, en la mucosa de los ojos, boca o nariz, después del contacto con agua o alimento contaminado (Picardeau, 2013). Una vez que ingresaron al organismo, circulan en el torrente sanguíneo, causando una fase de leptospiremia, que comienza desde minutos después de la inoculación hasta los 7 días, se

multiplican y alcanzan los tejidos al tercer día pos-infección. Las lesiones debidas a la acción de las toxinas leptospirales o componentes celulares tóxicos no se entienden bien, pero definen la aparición de los signos clínicos consecuentes que aparecen hasta 5-14 días después de la exposición. El desarrollo y la progresión de la enfermedad están influenciados por las características virulentas de la cepa, susceptibilidad del huésped y el tamaño del inóculo infectante durante la exposición (Ko et al., 2009).

El inicio de la enfermedad se correlaciona con la aparición de anticuerpos aglutinantes y la depuración de las leptospiras por opsonización y lisis mediadas por anticuerpos (Ko et al., 2009). La lesión primaria es el daño del endotelio de los vasos sanguíneos pequeños que conduce a isquemia localizada en los órganos, lo que resulta en necrosis tubular renal, daño hepatocelular y pulmonar, meningitis, miositis y placentitis. Las hemorragias ocurren en casos graves, así como la ictericia y trombocitopenia. Suele haber una granulocitosis leve y esplenomegalia (Adler y Peña Moctezuma, 2010; Adler, 2014).

El daño tisular, aunque es grave, puede ser reversible y seguir una reparación completa, como en hígado y riñón; o bien tener un daño duradero, por ejemplo, miocarditis donde se observan zonas de isquemias o “manchas blancas”, reportado en perros y cerdos (Adler y Peña Moctezuma, 2010).

## **1.5 Factores de virulencia**

Como ya se mencionó, los mecanismos por los cuales las leptospiras causan daño al tejido del huésped no están bien definidos (Adler y Peña Moctezuma, 2010); sin embargo, se han caracterizado varios determinantes de virulencia entre ellas, proteínas de superficie, lipopolisacáridos (LPS), motilidad y quimiotaxis, y proteínas secretoras que permiten que las espiroquetas penetren las barreras del tejido del organismo (Palaniappan et al., 2007).

Las proteínas de superficie o de la membrana externa son esenciales para las leptospiras durante la infección, han sido caracterizados OmpL1, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45, LipL48 y LigA. La adaptación ambiental de las leptospiras ha demostrado la expresión de ciertas proteínas solo *in vivo* durante la infección, tales como LigA, Qlp42, LipL32 y Loa22

el LPS, y otras más con mayor expresión en cultivos *in vitro* como LipL36 (Barnett et al., 1998).

La motilidad y quimiotaxis está regulada por la proteína de la vaina FlaA y la proteína del núcleo FlaB como componentes esenciales del endoflagelo (Adler y Peña Moctezuma, 2010).

Los LPS son moléculas estructurales con una toxicidad relativamente baja y que activan a los macrófagos a través de CD14 y el receptor Toll-like 2 (TLR2) (Werts et al., 2001). Provocan la producción de opsonina aglutinante y anticuerpos; sin embargo, no confieren una protección cruzada eficaz contra las diferentes serovariedades. Desencadenan el sistema innato mediante TLR2 y TLR4. La eficiencia en el reconocimiento de LPS por parte de los TLR2 principalmente, ha sido tal que se le confiere una inmunidad innata efectiva que produce cierta resistencia a leptospirosis en ratones (Raghavan et al. 2007).

Se han descrito dos principales proteínas secretoras, la hemolisina que desempeña un papel importante en la formación de poros, y la esfingomiélin con actividad hemolítica. Ambas con actividad de adhesión (Palaniappan et al., 2007).

Se ha demostrado que las leptospiras patógenas tienen la capacidad de evadir componentes del sistema inmunitario innato del huésped, como las células fagocíticas, los péptidos citolíticos y el sistema del complemento, mientras que las leptospiras no patógenas son envueltas y eliminadas por los fagocitos (Meri et al., 2005).

## **1.6 Signos clínicos**

La leptospirosis en bovinos puede presentarse en forma aguda, subaguda o crónica. La leptospirosis aguda es causada principalmente por la serovariedad Icterohaemorrhagiae, Pomona y Grippotyphosa (Smith, 2010); los animales jóvenes son más susceptibles, manifestándose con septicemia, fiebre alta de 40.5 a 41.5°, anorexia, petequias en mucosas, depresión, anemia hemolítica con hemoglobinuria, ictericia y palidez de mucosas. La mortalidad es elevada en becerros menores de 2 meses; y si hay cura clínica la convalecencia es prolongada (Divers y Peek, 2008). En el ganado adulto, se presenta septicemia durante



una a dos semanas, una caída repentina en la producción de leche, acompañada de ubre flácida con todas las glándulas mamarias afectadas; pueden presentar o no pirexia, la secreción de leche tiene apariencia roja, naranja o amarilla parecida al calostro con coágulos de sangre, el conteo de células somáticas es alto y aparece libre de organismos comunes que causan mastitis (Ellis, 2015). También pueden presentar hemoglobinuria y abortos en la fase septicémica (Divers y Peek, 2008).

Las formas subaguda y crónica son comunes en el ganado adulto. Al menos que se acompañe de fiebre, hemoglobinuria, ictericia o mastitis, puede no ser diagnosticada, con excepción de abortos epidémicos. Las serovariedades disciernen sobre la ocurrencia de abortos, la infección con serovariedad Pomona o Gryppotyphosa causan “tormentas” de abortos y en el caso de serovar Hardjo tipo hardjobovis y Hardjo tipo hardjoprajitno, se manifiestan en forma de abortos esporádicos entre el segundo y tercer tercio de gestación (Grooms, 2006); estas dos últimas serovariedades son causantes de la forma subclínica y persistente del tracto reproductivo (Fávero et al., 2017); además de abortos, también se pueden presentar partos prematuros, nacimiento de crías débiles, momificación fetal e infertilidad, que se manifiesta con un aumento de servicios por concepción e intervalos prolongados entre partos; disminución en la producción de leche o agalactia y mastitis (Grooms, 2006; Divers y Peek, 2008; Adler y Peña Moctezuma, 2010; Zuerner, et al., 2011).

La distribución y los patrones de infección pueden cambiar tanto por la adaptación de las serovariedades a otros hospedadores en un área, así como por los cambios climáticos y ecológicos (Hartskeerl et al., 2011; Pinto et al., 2016).

## **1.7 Diagnóstico**

El diagnóstico se basa en la interpretación de signos clínicos y mediante técnicas diagnósticas directas para confirmar la presencia de antígenos o ADN de *Leptospira* en sangre, orina o tejidos; mediante cultivos, pruebas inmunoquímicas (inmunofluorescencia e inmunohistoquímica), microscopía de campo oscuro o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Asimismo, hay técnicas indirectas o de serología basadas en la detección de

anticuerpos específicos en suero mediante aglutinación microscópica (MAT) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) (OIE, 2014).

### **1.7.1 Aislamiento bacteriano**

El cultivo bacteriano de cepas a partir de material clínico, presenta una baja sensibilidad debido al tiempo prolongado para su identificación, es difícil de realizar dado su crecimiento lento y medios de crecimiento especiales, por lo que no se utiliza como método de diagnóstico de rutina (Pinto et al., 2016). El aislamiento seguido de la tipificación a partir de portadores renales es importante y muy útil en estudios epidemiológicos para determinar qué serotipos están presentes en un grupo concreto de animales, en una especie animal o en una región geográfica (OIE, 2014).

### **1.7.2 Microscopia de campo oscuro**

Se utiliza para detectar organismos delgados, enrollados y en rápido movimiento. La sensibilidad de esta prueba es de aproximadamente  $10^7$  leptospiras/L. El examen directo de sangre y orina presenta una baja sensibilidad y especificidad, que está sujeto a una mala interpretación de los hilos de fibrina o proteínas, por lo que no se recomienda como un procedimiento de rutina (Musso y La Scola, 2013).

### **1.7.3 Pruebas inmunohistoquímicas**

Las pruebas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica son más sensibles que la microscopía en campo oscuro, pero con la misma probabilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos (Musso y La Scola, 2013). Son útiles para diagnosticar la infección en material patológico no apto para cultivo o donde se requiere un diagnóstico rápido (OIE, 2014); su eficacia depende del número de microorganismo presentes en el tejido y carecen de la sensibilidad de un cultivo. Excepto que se utilicen reactivos especialmente elaborados, este tipo de pruebas no identifican el serotipo infectante y sus resultados deben interpretarse en conjunto con los resultados serológicos.

#### **1.7.4 Reacción en cadena de la polimerasa**

La detección de genes restringidos a *Leptospira spp.* patógenas, como *lipL32*, *lgnl*, *ligA* y *ligB2*, en tejidos o en líquidos corporales se puede poner de manifiesto empleando diversas pruebas basadas en PCR de tiempo real o de punto final. La PCR proporciona una sensibilidad de 62-100% y una especificidad del 88.3 al 100%, siendo un diagnóstico rápido y confiable (Hernández-Rodríguez, et al., 2011; Mullan y Panwala, 2016; Miotto et al., 2018), puede confirmar el diagnóstico en la fase temprana de la enfermedad, antes de que los títulos de anticuerpos se encuentren en niveles detectables. La PCR en tiempo real es más rápida y menos sensible a la contaminación que la PCR de punto final. No es un método de diagnóstico de rutina ya que tiene como desventajas el costo elevado y la baja disponibilidad en áreas con recursos restringidos (Musso y La Scola, 2013); puede detectar un número extremadamente bajo de organismos y no identificar el serotipo infectante (Alt et al., 2001), aunque algunos grupos iniciadores pueden permitir un mayor grado de identificación a nivel de especie o de cepa si se secuencian los amplicones de la PCR (OIE, 2014). Sin embargo, se ha demostrado que la sensibilidad aumenta en pruebas como ELISA y MAT, en un 96.5% y el 93.1%, respectivamente, junto con PCR (Mullan y Panwala, 2016).

#### **1.7.5 Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas**

De las técnicas indirectas, el ELISA detecta anticuerpos IgG e IgM que reaccionan con un antígeno específico de género ampliamente reactivo, estos pueden ser detectables durante varios meses o incluso años; sin embargo, no es adecuado para la identificación de la serovariedad o serogrupo causante de la infección. El ELISA suele ser positivo desde el día 6-8, aunque puede ser negativo antes (Musso y La Scola, 2013). La sensibilidad presentada varía de 43 a 100% y la especificidad de 76 a 98% (Mullan y Panwala, 2016). Los ELISA basados en proteínas de membrana externa recombinantes son ampliamente reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospiras patógenas y por lo tanto no tienen valor en los estudios epidemiológicos. Por el contrario, los ELISA basados en antígenos lipopolisacáridos son específicos de serogrupo y sí tienen utilidad en los estudios epidemiológicos y los planes de control (OIE, 2014).

### **1.7.6 Prueba de aglutinación microscópica**

La prueba consiste en una serie de diluciones que utiliza organismos vivos como antígenos, el título de punto final se define como la dilución de suero que muestra un 50% de aglutinación. Tiene una sensibilidad entre 40-89.2% y una especificidad del 85.97 al 100% (Hernández-Rodríguez et al., 2011), aunque es más simple y rápido que el cultivo, requiere el mantenimiento de una colección de antígenos vivos durante largos periodos de tiempo. La evaluación de la prueba es subjetiva, y la MAT sólo es capaz de proporcionar resultados de serogrupos específicos, lo que limita la interpretación de la prueba desde un punto de vista epidemiológico, además de que no proporciona una buena aplicabilidad como indicador de portador. A pesar de estas limitaciones, no sólo en sensibilidad sino también en la especificidad y la ocurrencia de reacciones cruzadas, sigue siendo la herramienta más utilizada considerada como prueba de referencia o estándar por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2003).

El diagnóstico de leptospirosis por medio de MAT tiene tres puntos importantes a considerar: el muestreo, el panel de antígenos y el punto de corte. El muestreo debe ser representativo de animales y rebaños que se tomarán de la región, se recomienda al menos un 10% de muestras del total de la población, para obtener resultados confiables. El panel de antígenos utilizado en MAT tiene gran importancia, y aunque muchas cepas de referencia internacionalmente reconocidas están disponibles, varía frecuentemente entre laboratorios. La OIE (2014), recomienda la utilización de al menos una serovariedad representativa de todos los serogrupos que se conocen en la región y en muchos casos el uso de cepas locales como antígenos para una mayor sensibilidad de la prueba. El establecimiento del punto de corte se debe basar en la presentación de la enfermedad. Las infecciones crónicas y subclínicas, en particular las determinadas por las cepas adaptadas al huésped pueden ir acompañadas de títulos bajos, mientras que la enfermedad aguda suele asociarse con títulos altos. Además, el grado de endemidad en una región específica también puede ser considerado para determinar un punto de corte apropiado, lo que sugiere que los puntos de corte pueden variar entre las especies y/o regiones estudiadas. Se sugiere 1/50 o 1/100 como punto de corte mínimo, en casos de estudios en vida silvestre, en el que el objetivo es determinar la exposición con el agente. Por el contrario, si el propósito incluye la asociación de signos

clínicos y/o falla reproductiva, como es el caso en bovinos, se requieren puntos de cortes más altos (1/200) en regiones endémicas (Picardeau, 2013). Otros factores por considerar, es que MAT no hace diferencia entre infecciones actuales, recientes o pasadas, así como también de anticuerpos posvacunales (Musso y La Scola, 2013).

En el caso de bovinos, el aborto provocado por el serotipo Pomona, normalmente se acompaña de títulos altos en el momento del aborto, debido a que el incidente clínico tiene lugar relativamente pronto después de la infección. Se debe considerar que el aborto en el ganado vacuno se debe principalmente al serotipo Hardjo durante la infección crónica; en este caso, la respuesta serológica en el momento del aborto es más variable, apareciendo algunos animales seronegativos y otros que muestran títulos altos. El ganado vacuno puede experimentar una caída en la producción de leche durante la fase aguda de la infección por Hardjo, y este síntoma clínico está asociado con títulos altos (OIE, 2014).

La lectura e interpretación de las reacciones de estas pruebas, requiere cierta capacitación y experiencia para interpretarlas correctamente, ya que la variabilidad de los puntos finales puede proporcionar resultados inconsistentes (Musso y La Scola, 2013).

## **1.8 Medicina preventiva y control**

La leptospirosis forma parte de la lista de enfermedades y plagas exóticas y endémicas en animales de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, se clasifica en el grupo 3, integrada por enfermedades y plagas endémicas transmisibles que se encuentran en el territorio nacional pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, siendo de notificación mensual obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE). La vigilancia se limita en gran medida a las investigaciones de diagnóstico, lo que puede afectar la identificación oportuna de cambios en su comportamiento, así como una subestimación marcada de número de casos confirmados y muertes proporcionadas por los centros de referencia nacionales (Hartskeerl et al., 2011).

Hasta la fecha no existen modelos adecuados ni medidas de adaptación generales que puedan ser efectivas para evitar o reducir los impactos en la salud en México, además debido a las condiciones ambientales favorables para la supervivencia de la bacteria y la diversidad de fauna silvestre que puede actuar como reservorio, el control de la leptospirosis bovina en ambientes tropicales puede ser un desafío costoso y frustrante.

Se recomienda un programa de control integral basado en modificaciones específicas de manejo, antibióticos y vacunación; que al presentarse claramente con un enfoque constante y a largo plazo, con un monitoreo periódico del rebaño, evitará el recrudecimiento de la enfermedad (Martins y Lilenbaum, 2017). A continuación, se enlistan algunas medidas de control de leptospirosis bovina.

**1. Manejo de medidas zoonositarias y bioseguridad.** La implementación de medidas restrictivas es crucial para lograr una erradicación exitosa a largo plazo.

**2. Cuarentena interna.** Evita la posible transmisión en cadena de la enfermedad a otros animales susceptibles dentro de una instalación; en el caso de vacas abortadas, este tipo de aislamiento es lo ideal para evitar el contacto de secreciones uterinas con otros animales.

**3. Programas de higiene.** Éstas deberán incluir medidas de limpieza y desinfección del personal, vehículos, instalaciones, equipo y utensilios antes, durante y después del proceso productivo; así como evitar que el suelo tenga formación de encharcamientos o zonas pantanosas que aumenten el riesgo de exposición.

**4. Minimizar el riesgo de introducción.** Delimitación de la unidad de producción con una cerca perimetral, así como establecer registros de entrada y salidas a ésta.

**5. Control de fauna nociva.** Deberá introducirse en el establo rodenticida, trampas y protección de alimentos, en respuesta a un aumento en la abundancia de roedores que establecen un mayor riesgo de transmisión.

**6. Despoblación.** Para la serovariedad Hardjo adaptada al anfitrión es necesario evitar o eliminar el estado de portador renal en el ganado bovino (Hartskeerl et al., 2011; Mughini-Gras et al., 2014).

### **1.8.1 Quimioprofilaxis**

El tratamiento con antibióticos se utiliza habitualmente para disminuir el riesgo de transmisión de leptospirosis en el ganado que se prepara para la importación o exportación y durante la cuarentena del ganado antes de su introducción al rebaño (Alt et al., 2001).

La dihidroestreptomicina ha sido y sigue siendo el antibiótico de elección más utilizado en el tratamiento de leptospirosis bovina. Tradicionalmente se ha recomendado una sola aplicación IM de 25 mg/kg para disminuir el riesgo de transmisión y para prevenir abortos y otros problemas reproductivos (Alt et al., 2001; Martins y Lilenbaum, 2017). El uso de antibióticos representa una herramienta importante para el control en el ganado, siempre considerando que su uso es relativamente caro, así como los tiempos de retiro en leche y carne (Martins y Lilenbaum, 2017).

### **1.8.2 Vacunación**

La vacunación en humanos y animales se han utilizado desde la década de 1920, casi todos se prepararon a partir de células leptospirales enteras muertas mediante calor, formalina, fenol, irradiación, entre otros métodos. El uso de leptospiras no definidas, no virulentas vivas, atenuadas o saprófitas no ha ganado aceptación. Muchas de estas preparaciones tempranas eran demasiado reactogénicas para el uso generalizado. Los intentos de reducir la reactogenicidad han incluido el uso de medios libres de proteínas para el crecimiento de las leptospiras y el uso de fracciones subcelulares, cuyo componente activo casi con seguridad fue el LPS (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010).

Las vacunas contra la leptospirosis para uso veterinario son suspensiones de una o más cepas patógenas de *Leptospira* spp. inactivadas o muertas, denominadas bacterinas, de tal manera que su inducción de anticuerpos contra epítomos de carbohidratos del LPS, son responsables de la diversidad antigénica observada entre las seriovariedades leptospirales. Por esta razón

las vacunas utilizadas a menudo no proporcionan protección cruzada contra las serovariedades que no están contenidas en la preparación (Guerrero et al., 2001).

La inmunización mediante vacunación representa una medida esencial para el control de la leptospirosis, que ofrece ser un método barato y fuertemente recomendado (Martins y Lilenbaum, 2017). Su utilización en animales está dirigido a la protección misma del animal, así como los humanos que con ellos contactan, por tanto, constituye una herramienta clave en los programas de control y erradicación (OIE, 2014).

Su implementación deberá ser antes de la exposición y una revacunación anual de acuerdo con lo recomendado por la OIE (2014). Otros protocolos implementados consideran la vacunación a terneros de 4 a 6 semanas de edad y una segunda aplicación 4 a 6 semanas después, seguido de la revacunación semestral o anual, dependiendo de la prevalencia en el hato (Mughini-Gras et al., 2014). Para que un programa de vacunación funcione, es necesario llevar a cabo estudios epidemiológicos en los que se evalúe la incidencia de los distintos serotipos de *Leptospira* en una población determinada. Por ejemplo, la protección contra la infección por Hardjo en el ganado ha sido subóptima, por esta razón, el ganado se vacuna hasta cada tres meses en áreas de alta prevalencia de leptospirosis (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010).

La vacunación y el tratamiento con antibióticos se han utilizado para reducir el riesgo de transmisión de leptospirosis en bovinos, con resultados variables y parcialmente efectivo debido en parte a la naturaleza restringida de la inmunidad inducida por la vacuna y la presencia de serovariedades locales distintos de los incluidos en la vacuna (Zimmerman et al., 2013).

Actualmente, el mercado ofrece bacterinas pentavalentes contra serovariedades Canicola, Gryppothyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae y Pomona para prevenir la presentación de signos clínicos y limitar la propagación de la enfermedad causada por especies de *Leptospira*. Sin embargo, no previenen la colonización renal y posterior la eliminación en orina, principalmente en infecciones causadas por Hardjo tipo hardjo-bovis (Sanhueza et al., 2018).



### 1.8.3 Tratamiento con antibióticos

Los antibióticos antimicrobianos comúnmente usados para el tratamiento de leptospirosis son dihidroestreptomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalexina, ceftriaxona, cefalotina, doxiciclina, oxitetraciclina, eritromicina y tilmicosina (Alt et al., 2001, Suepaul et al., 2015).

Con base en pruebas *in vitro* o ensayos terapéuticos en animales experimentales, se ha encontrado que varios serotipos de leptospiras patógenas son susceptibles a casi todos los antibióticos de uso común (Alexander y Rule, 1986); estas pruebas de susceptibilidad no se correlacionan con la eficacia *in vivo*, y el valor predictivo en modelos que han involucrado animales de laboratorio para evaluar el tratamiento de infecciones crónicas, aplicado a bovinos infectados con serovariedad Hardjo, puede ser de valor cuestionable (Gerritsen et al., 1993; Alt et al., 2001).

Hasta la fecha, el tratamiento de elección en leptospirosis bovina sigue siendo dihidroestreptomicina a dosis única de 25 mg/kg IM; con esta dosis, se logra disminuir el riesgo de transmisión (Martins y Lilenbaum, 2017). Sin embargo, la infección persiste en riñones y tracto reproductivo (Alt et al., 2001). Otros protocolos han sido evaluados; por ejemplo, dihidroestreptomicina a dosis única 25 m/kg IM en combinación con penicilina G procaínica con eficacia clínica en infecciones por *L. borgpetersenii* serovar Hardjo; no así para *L. interrogans* serovar Hardjo (Alt et al., 2001).

La dihidroestreptomicina no está aprobada por la FDA para su uso en Estados Unidos, lo que ha llevado a la necesidad de probar otros antibióticos en el tratamiento de leptospirosis. Por ejemplo, la oxitetraciclina a 20 mg/kg IM, tilmicosina a 10 mg/kg SC dosis única y ceftiofur a 2.2 - 5 mg/kg IM una vez al día durante 5 días, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de infecciones por serovar Hardjo para evitar la excreción urinaria de leptospiras, pero con la limitante de ser dosis mayores, que prolongan los tiempos de retiro y el costo del tratamiento (Alt et al., 2001; Cortese et al., 2014; Martins y Lilenbaum, 2017).

La ciprofloxacina y levofloxaxina son dos antibacterianos del grupo de las fluoroquinolonas que también han sido probadas con resultados alentadores en el tratamiento de leptospirosis en hámster como modelo animal, reduciendo la mortalidad hasta en un 90 y 95 % a dosis elevadas (Griffith et al., 2007).

### **1.8.3.1 Fluoroquinolonas**

Las quinolonas y fluoroquinolonas son el grupo de fármacos sintéticos de más desarrollo en la actualidad. Desde su aportación a la comunidad médica en 1962 por Leshner, ácido nalidíxico fue utilizado para la terapia en infecciones de vías urinarias en humanos (Martínez et al., 2006).

A los ácidos nalidíxico, pipemídico, oxolínicos y cinoxacina se incluyen en la primera generación. La adición en la posición 6 de flúor, permitió que se convirtieran en las de segunda generación y dio origen a las fluoroquinolonas, que mostraron una mayor eficacia antibacteriana contra Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram-negativas, incluidas *P. aeruginosa* y ciertos cocos Gram-positivos. También aumentaron su biodisponibilidad oral y distribución sistémica en comparación a la primera generación. Entre estas se encuentran: ciprofloxacina, norfloxacina, difloxacina, enoxacina, marbofloxacina, flumequina, cinoxacina, tosufloxacina, y difloxacina. Los cambios en la posición 7 diferencian a las quinolonas de tercera generación, enrofloxacina, danofloxacina, sarafloxacina, ofloxacina, amilofloxacina, tosufloxacina, fleroxacina, levofloxacina, esparfloxacina y pefloxacina. Esta modificación hizo posible un espectro mayor, incluyendo gramnegativos, grampositivos y bacterias atípicas, como micobacterias y micoplasmas (Gootz T. y Osheroff, 2003; Sumano, et al., 2015).

Las fluoroquinolonas de tercera generación presentan un pKa más alto, esto tiene un gran efecto sobre su solubilidad y su coeficiente de partición, lo que a su vez determina sus excelentes propiedades farmacocinéticas de penetración tisular, lenta eliminación y con esto una mayor eficacia clínica. Tienen menores efectos tóxicos sobre sistema nervioso central y exhiben menos interacciones con el sistema citocromo P450 (Dudley, 2003).

Actualmente hay seis fluoroquinolonas que han sido aprobadas por la FDA para su uso en animales en Estados Unidos, estas incluyen la enrofloxacin, difloxacin, danofloxacin, marbofloxacin orbifloxacin y sarafloxacin (Martínez et al., 2006).

### **1.8.3.1.1 Enrofloxacin**

La enrofloxacin ha sido de gran utilidad en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones de vías urinarias, digestivas, respiratorias, de piel, otitis y mastitis mediante la administración oral y parenteral en dosis de 2.5 mg/kg hasta 20 mg/kg de peso en prácticamente todas las especies (Gutiérrez et al.,2014; Sumano et al., 2015). Se inactiva poco en presencia de suero y otros fluidos orgánicos. Actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular (Sumano et al., 2015). Posee un amplio espectro de actividad, con tiempos de retiro muy cortos, lo que la convierte en adecuada para los animales de producción (Babaahmady & Khosravi, 2011).

La enrofloxacin se encuentra en forma de cristal, color amarillo pálido, es ligeramente soluble en agua. Puede encontrarse en 4 isoformas: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico, todos ellos dependiendo del pH al que se encuentren, a pH ácido, el grupo piperazinilo y el grupo carboxilo se encuentran protonados y a pH básico ninguno de ellos se encuentra protonados. Su máxima solubilidad se logra a un pH de 5.02 y el mayor porcentaje de transferencia de fase acuosa a fase orgánica se encuentra a un pH de 7. Esto significa que cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso de enrofloxacin a las bacterias en forma de zwitterion a través de canales de porinas hidrofílicas, mientras que al encontrarse en pH ácido se encuentra en forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión ni por los canales de porinas (Gootz T. y Osheroff, 2003; Sumano, et al., 2015).

### **1.8.3.1.2 Farmacodinamia**

La enrofloxacin es un agente bactericida que actúa inhibiendo la ADN-girasa bacteriana (topoisomerasa tipo II) y la topoisomerasa IV, ambas enzimas son esenciales en los procesos celulares, incluida la replicación de ADN. La enrofloxacin tiene afinidad a la ADN-girasa bacterias Gram –, mientras que para Gram +, lo es topoisomerasa IV. La ADN girasa y la

ADN topoisomerasa IV, son enzimas tetraméricas que comprenden dos copias de las subunidades GyrA y Gyr B o subunidades ParC y ParE, respectivamente (Gootz y Osheroff, 2003; Hawkey, 2003).

El mecanismo por el cual actúan las fluoroquinolonas es interfiriendo en la separación de las dos cadenas ADN de doble hélice durante la replicación o transcripción. Cuando la ADN-girasa susceptible se expone, la fluoroquinolona interactúa en la superficie de un dominio alfa-helicoidal, induciendo superdesenrollamientos negativos en el ADN, ésta es una reacción de ATP dependiente que logra la separación de ambas cadenas de ADN para permitir el pasaje de un segmento de ADN a través de la fractura, el cual es posteriormente liberado. La inhibición de este proceso bloquea múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales para la bacteria (Martínez et al., 2006; Sumano et al., 2015).

Las fluoroquinolonas muestran un efecto paradójico, a concentraciones cerca de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la bacteria, el fármaco tiene un efecto bacteriostático. A medida que aumenta la concentración del fármaco en relación con la CMI, la destrucción bacteriana aumenta causando un efecto bactericida (Martínez et al., 2006). La muerte de las bacterias susceptibles ocurre dentro de los 20 a 30 minutos de la exposición. La enrofloxacin tiene un efecto pos-antibiótico significativo, tanto para bacterias Gram – como Gram +, con duración de 1 a 4 horas. Aún a concentraciones por debajo de la CMI, las fluoroquinolonas inhiben la división celular, reducen la tasa de crecimiento bacteriana que previenen la colonización de tejidos específicos, interfieren en la expresión de virulencia y aumentan la susceptibilidad de algunos microorganismos a la fagocitosis. La enrofloxacin es capaz de penetrar las células y alcanzan concentraciones muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas (Hawkey, 2003; Sumano, et al., 2015)

La enrofloxacin puede tener pequeñas diferencias en su actividad dependiendo del pH, es decir tiene menor actividad contra bacterias Gram – en medio ácido que en medio básico. Sin embargo, la eficacia frente a bacterias Gram +, no parece ser afectada por el pH del medio. En general poseen poca actividad contra bacterias anaerobias y menos eficaces contra

anaerobios facultativos desarrollados en condiciones anaeróbicas (Plumb, 2008; Sumano et al., 2015).

### **1.8.3.1.3 Farmacocinética**

Los mecanismos de absorción de las fluoroquinolonas, son poco entendidos. Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que éstas son ampliamente absorbidas por difusión pasiva y procesos activos, y parecen distribuirse en un espacio que excede el agua corporal total. Por tanto, la alta homogenización de las concentraciones del fármaco hace inaccesible el paso de las bacterias al espacio intersticial, de igual forma es capaz de penetrar intracelularmente como en infecciones por *Chlamydia spp.* y *Mycoplasma spp.*, entre otros (Dudley, 2003).

La enrofloxacin se absorbe bien después de la administración oral en la mayoría de las especies. En los perros, la biodisponibilidad de la enrofloxacin es de aproximadamente 80% posterior a la administración oral, mientras que en borregos y aves varía de 60-75%. En rumiantes, la biodisponibilidad es muy baja, aproximadamente del 10% en bovinos (Martínez et al., 2006). La absorción parenteral de preparados con pH no mayor a 10.4 es buena, mayor al 80% en casi todas las especies, pero muchos preparados difieren de este valor por los componentes del vehículo. El 50% de la concentración máxima se logra 15 minutos después de suministrar el fármaco y los niveles máximos se alcanzan en 1 hora pos-administración (Sumano et al., 2015).

La enrofloxacin se distribuye bien a diversos tejidos, posee un volumen de distribución área de 2 a 4 L/kg dependiendo la especie. Por ejemplo, 1.5, 3-4 y 0.4 en bovinos, caninos y ovinos respectivamente (Plumb, 2008; Sumano et al., 2015). Las concentraciones más altas se encuentran en la bilis, los riñones, el hígado, los pulmones y el aparato reproductivo. La enrofloxacin se concentra en los macrófagos y parece tener un efecto inmunoestimulante ponderable. También se alcanzan niveles terapéuticos en hueso, líquido sinovial, piel, músculo, humor acuoso y líquido pleural. En el líquido cefalorraquídeo se presentan bajas concentraciones; los niveles alcanzan sólo el 6-10% de aquellos encontrados en suero (Dudley, 2003).

Tiene una transformación hepática y efecto de primer paso bajo, las rutas metabólicas importantes para la transformación son dealquilación, acetilación, glucuronidación, oxidación, sulfoxidación y ruptura del anillo piperazinilo. Aproximadamente el 10-40% de la enrofloxacin circulante se metaboliza a ciprofloxacina en la mayoría de las especies, y la acción conjunta de enrofloxacin con ciprofloxacina podrían generar un efecto antibacteriano potenciado (Dudley, 2003; Sumano et al., 2015).

La eliminación es principalmente renal, aproximadamente el 15-50% de la enrofloxacin se excreta sin cambios por orina, tanto por secreción tubular como filtración glomerular. La vida media de eliminación ( $T_{1/2\beta}$ ) varían entre especies, aproximadamente son de 3 horas o menos, principalmente en aves, y de hasta 10 horas para presentaciones inyectables (Plumb, 2008; Sumano et al., 2015).

#### **1.8.3.1.4 Relación Farmacocinética-Farmacodinamia**

El uso de la relación Farmacocinética-Farmacodinamia (PK/PD) para la evaluación de compuestos antibacterianos es una herramienta muy importante y ampliamente utilizada en medicina veterinaria. Su implementación involucra el uso de antibacterianos de forma racional y apropiada para contribuir a la reducción de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones. Es necesario establecer estudios farmacocinéticos para conocer la evolución de la concentración del fármaco en diferentes fluidos del paciente o especie objetivo a lo largo del tiempo, durante el cual el fármaco se somete a diferentes procesos que condicionan la cinética y el perfil de concentración-tiempo, que se caracterizan por parámetros PK, tales como concentración plasmática máxima, volumen de distribución, área bajo la curva de concentración vs tiempo, aclaramiento corporal total, unión a proteínas plasmáticas o la biodisponibilidad. Los estudios farmacodinámicos aportan los conocimientos sobre el efecto del fármaco sobre el patógeno y los mecanismos mediante los cuales lo logra; el principal indicador del efecto es la CMI y proporciona datos sobre la susceptibilidad del patógeno contra el antibacteriano. El análisis PK/PD integra toda esta información lo que permite seleccionar el antibacteriano óptimo y el régimen de dosificación para cada caso, minimizando la incidencia de efectos secundarios y la aparición de resistencias (Papich, 2014; Asin-Prieto et al., 2015; Canut et al., 2015).

Para el análisis PK/PD se consideran el tiempo durante el cual la concentración del fármaco permanece sobre la CMI ( $T > CMI$ ), la concentración máxima y la relación CMI ( $C_{MAX}/CMI$ ) y el área sobre la curva de concentración vs tiempo y la relación CMI ( $AUC/CMI$ ) como predictivos de eficacia (Kitamura et al., 2014).

Desde el punto de vista de actividad PD, los antibacterianos han sido clasificados en función de su actividad antibacteriana, así la actividad puede ser dependiente del tiempo o con actividad dependiente de la concentración. Para antibacterianos con actividad dependiente de la concentración los índices predictivos de eficacia son  $C_{MAX}/CMI \geq 10-12$  para aminoglucósidos y  $C_{MAX}/CMI \geq 10$  y  $AUC/CMI \geq 125$  para fluoroquinolonas (Canut et al., 2015).

### **1.8.3.2 Enrofloxacin clorhidrato-dihidrato**

En la actualidad, además del desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos, la manipulación farmacéutica ha permitido optimizar el mecanismo de acción de los antibacterianos existentes mediante técnicas como la re-cristalización, métodos de trituración, secado por pulverización, dispersiones sólidas, micronización, nanosuspensión, técnicas criogénicas, entre otras (Savjani et al., 2012).

Se han desarrollado técnicas de ingeniería para la cristalización controlada de medicamentos para producir polvos de alta pureza con una distribución de tamaño de partícula bien definida, forma cristalina o amorfa. Con la manipulación de las condiciones de cristalización, es posible generar cristales con diferente disposición de espacio entre partículas, denominados *polimorfos*. Los polimorfos para el mismo medicamento pueden diferir en sus propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad, la velocidad de disolución, el punto de fusión y la estabilidad. Durante el proceso de cristalización, es posible atrapar moléculas del solvente dentro de la red. El resultado es un hidrato o bien un solvato (Savjani et al., 2012).

En el Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se ha desarrollado un nuevo solvato recristalizado clorhidrato-

dihidrato de enrofloxacin (Enro-C) Patente 472715: Instituto Mexicano de la Protección Industrial, México. La Enro-C ha sido caracterizada (Miranda-Calderón et al., 2014) y ha demostrado una mayor solubilidad en agua, en comparación con la enrofloxacin. En suspensión tiene un pH de 6.2-6.8, por lo que se ha aplicado desde vía intramuscular, subcutánea e intramamaria, sin causar daño en tejidos después de su administración en diferentes animales (Gutiérrez et al., 2015; Martínez-Cortés et al., 2016; Carrascosa et al., 2017; Viveros et al., 2017; Mendoza et al., 2018; Sumano et al., 2018).

Estudios previos con Enro-C en pollos demostraron concentraciones séricas máximas ( $C_{MAX}$ ) 2.26 veces mayores y una biodisponibilidad relativa de 336% en comparación a la enrofloxacin de referencia (Baytril®) (Gutiérrez et al., 2015). En hámsteres, Carrascosa et al. (2015), demostraron valores  $C_{MAX}$  6.7 veces y  $AUC_{0-24}$  23 veces más altos para Enro-C VS Baytril®; posteriormente, se obtuvieron curas clínicas y bacteriológicas de 100 y 94% respectivamente, en hámsteres tratados con Enro-C después de la infección experimental con *Leptospira interrogans* serovar Canicola (Carrascosa et al., 2017). Estudios farmacocinéticos en perros después de la administración oral y parenteral de Enro-C, demostraron concentraciones útiles para el tratamiento de leptospirosis mediante simulaciones Monte Carlo, usando  $C_{MAX}$  y  $AUC_{0-24}$  como variables PK predictivas de eficacia (Sumano et al., 2018), y demostradas en casos clínicos con resultados de 100% de curas clínicas y bacteriológicas, confirmadas mediante PCR (Gutiérrez et al., 2019).

Los estudios farmacocinéticos en bovinos, sus evaluaciones PK/PD y la integración de éstos a simulaciones Monte Carlo, resultó que dos de las tres dosis probadas, podrían ser útiles en el tratamiento de leptospirosis bovina (Mendoza et al., 2018). Sin embargo, se necesita diseñar estudios clínicos en vacas infectadas con *Leptospira* spp., para garantizar su uso en la terapéutica veterinaria. Esto ha motivado a desarrollar el presente estudio, el cual está enfocado en probar la eficacia clínica de la Enro-C en el tratamiento de leptospirosis bovina.



## II. HIPÓTESIS

La administración de 15 mg/kg de clorhidrato-dihidrato de enrofloxacin (Enro-C) por vía intramuscular cada 24 horas durante 5 días, generará curas clínicas en vacas infectadas por *Leptospira* spp. de al menos un 80% de los casos.

## III. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de clorhidrato-dihidrato de enrofloxacin (enro-C) en el tratamiento de leptospirosis en bovinos.

### 3.2 Objetivos específicos

- 1.- Identificar y diagnosticar casos de leptospirosis en vacas mediante examen clínico general y titulación de anticuerpos contra leptospira usando la prueba de microaglutinación (MAT).
- 2.- Instaurar tratamientos a dosis de 15 mg/kg de Enro-C cada 24 horas durante 5 días IM, en vacas diagnosticadas con leptospirosis.
- 3.- Evaluar la eficacia del tratamiento mediante examen clínico y titulación de anticuerpos contra leptospira usando la prueba de microaglutinación (MAT).

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, municipio localizado entre los paralelos 19° 50' 27'' latitud norte; los meridianos 98° 58' 53'' de longitud oeste; altitud 2 266 msnm. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (60%) y semiseco templado (40%), el rango de temperatura y precipitación pluvial es de 12-16°C y 500-700 mm, respectivamente (INEGI, 2017). La cuenca está integrada por 126 establos, de los cuales sólo 60 se mantienen en funcionamiento, en un área de 120 Ha. Las condiciones de los establos en funcionamiento atraviesan por una situación en proceso de deterioro con instalaciones con poco mantenimiento, las instalaciones de cada establo corresponden a corrales de libre acceso con pisos de concreto, camas de arena, comederos de tipo canoa y bebederos de concreto; los corrales poseen poco drenaje (Figura 4.1), que provoca encharcamientos y la limpieza en cada corral varía de 1-2 veces al día a una vez cada tercer día. Es común la presencia de perros y roedores, lo que constituye una fuente de transmisión (Figura 4.2). Cada establo lleva un manejo reproductivo una vez o 2 por semana; lo anterior caracteriza a Tizayuca en un ambiente ideal para la presentación y diseminación de leptospirosis bovina y otras enfermedades, sin embargo, las mismas condiciones limitan el control del experimento.



Figura 4.1 (A) Inundación en Cuenca lechera de Tizayuca. (B) Encharcamiento y manejo de excretas deficiente en corrales



Figura 4.2 (A) Presencia de perros y (B) ratas que actúan como reservorios de *Leptospira* spp

#### 4.2 Población animal y criterios de inclusión

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Investigación, Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento Oficial Mexicano NOM-062-ZOO-1999 (SADER, 1999). Fueron incluidas cincuenta y seis vacas de raza Holstein Friesian, con un peso promedio de  $583 \pm 62$  kg, edad de 2 a 5 años; en producción láctea o durante periodo de secado previamente diagnosticadas con problemas reproductivos recientes; sin

inmunización contra leptospira o con registro de bacterinas utilizadas, en este caso, sólo se consideraron para este estudio vacas con 60 o más días después de la inmunización utilizando bacterinas con *Leptospira* spp. Sin registro de haber recibido tratamiento con antibacterianos por lo menos 5 días antes del estudio. No se estableció un grupo control no tratado por cuestiones éticas (Paulus et al., 2013; Kramer y Front, 2017) por lo tanto, se llevó a cabo un ensayo clínico longitudinal abierto.

Durante el estudio, las vacas se mantuvieron con el resto del hato. Fueron alimentadas de forma habitual al establo de acuerdo con el estado fisiológico y productivo, la alimentación se basó en una dieta balanceada de forraje y concentrado con diferentes grados de inclusión, adición de minerales, cubriendo las necesidades nutricionales. Los requerimientos de agua fueron proporcionados a libre acceso, durante todo el día.

Después de realizar la anamnesis, las vacas fueron examinadas clínicamente con el objetivo de diagnosticar leptospirosis aguda o crónica, los signos que se consideraron fueron fiebre, hemoglobinuria, ictericia, mastitis con secreción amarilla o naranja, abortos entre el segundo y tercer tercio de gestación, fetos con autólisis o momificados y nacimiento de becerros débiles o mortinatos. El diagnóstico se complementó con titulación de anticuerpos antileptospira (MAT). Basados en hallazgos de signos clínicos, se diseñó un sistema de puntuación para diagnosticar leptospirosis bovina; riesgo alto >10, riesgo medio 6-9 y riesgo bajo <5 (cuadro 4.1)

En el estudio se incluyeron vacas con riesgo alto y medio de leptospirosis bovina, incluido MAT ideal >800 a >200, como lo indica la OIE (2014) debido a la endemicidad de la región. Se excluyeron vacas con riesgo bajo, incluido MAT <200.

Cuadro 4.1 Calificación de diagnóstico de leptospirosis con base en el nivel de riesgo

| Signos clínicos                                 | Títulos de anticuerpos <sup>6-8</sup> |                     |              |                     |              |
|---|---------------------------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
|   | Calificación                          | Con<br>inmunización | Calificación | Sin<br>inmunización | Calificación |
| Abortos <sup>1-3</sup>                          | 3                                     | >1:800              | 5            | ≥1:400              | 5            |
| Feto momificado <sup>3</sup>                    | 3                                     | 1:400               | 4            | 1:200               | 4            |
| Ubre flácida <sup>4</sup>                       | 2                                     | 1:200               | 2            | 1:100               | 3            |
| Terneros débiles o mortinatos <sup>1,3</sup>    | 2                                     | 1:100               | 1            | <1:100              | 1            |
| Historia previa de aborto <sup>4</sup>          | 2                                     | <1:100              | 0            | No reactivo         | 0            |
| Aumento en repetición de celos <sup>5</sup>     | 1                                     |                     |              |                     |              |
| Aumento entre intervalos de partos <sup>4</sup> | 1                                     |                     |              |                     |              |

Suma de valores para el diagnóstico de leptospirosis: <5 riesgo bajo, 6-9 riesgo medio, >10 riesgo alto

<sup>1</sup>Atxaerandio et al. 2005; <sup>2</sup>Adler y de la Peña, 2010; <sup>3</sup>Calla, 2010; <sup>4</sup>Ramos, et al. 2006;

<sup>5</sup>Zimmerman, et al. 2013; <sup>6</sup>Bolin, 2001; <sup>7</sup>Rinehart et al. 2012; <sup>8</sup>Pinto et al. 2016

#### 4.2.1 Titulación de anticuerpos

Se colectaron 6-8 mL de sangre mediante punción de la vena coccígea o yugular utilizando tubos comerciales de extracción de sangre al vacío. El suero se recuperó por centrifugación a 3,000 g durante 10 minutos. Las muestras fueron tomadas justo antes del tratamiento y 30 días después. Las muestras de suero fueron enviadas al Departamento de Microbiología e inmunología (FMVZ-UNAM) para su análisis mediante microaglutinación (Goris & Hartskeerl, 2014). Se utilizó un panel de antígenos que incluyeron las serovariedades Autumnalis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Gryppotyphosa, Hardjo (hardjoprajitno), Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi y Wolffi, de acuerdo con estándares internacionales (OIE, 2014). La prueba se repitió 28-35 días después del tratamiento.

#### 4.3 Tratamiento antibacteriano

El lote de Enro-C utilizado fue sintetizado como se describe en la patente mexicana (MX / a / 2013/014605) (Instituto Mexicano de la Protección Industrial, presentado en diciembre de

2013, Ciudad de México), basada en buenas prácticas de fabricación y regulada de acuerdo con la NOM-012-ZOO-1993 (SADER, 2004). Justo antes de la inyección, los envases que contenían Enro-C (50 g) se suspendieron con 500 mL de agua estéril inyectable mediante agitación vigorosa durante 30 s.

Las vacas fueron tratadas con 15 mg/kg Enro-C de una solución al 10% una vez al día durante 5 días por vía IM usando jeringas de 20 mL con agujas de calibre 18. El volumen de inyección varió entre 40 y 60 mL, por lo que fue necesario más de un sitio de aplicación. Los sitios de aplicación fueron tabla del cuello, primero izquierda y después derecha, luego músculos glúteos en el mismo orden, estableciendo tantos sitios como fue necesario.

#### **4.4 Análisis estadístico**

La resolución de signos clínicos después del tratamiento con Enro-C, fueron analizados usando estadística descriptiva.

Se obtuvieron los promedios de los títulos séricos de anticuerpos antileptospira de cada una de las serovariedades (Autumnalis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Gryppotyphosa, Hardjo (hardjoprajitno), Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi y Wolffi) antes y 28-35 días después del tratamiento, posteriormente se obtuvo un promedio de todas las serovariedades para ser analizados mediante prueba de  $t$  para muestras pareadas con  $P < 0.05$  (Sheskin, 2011). Fue necesario eliminar los datos de la serovariedad Autumnalis debido a un comportamiento atípico y que provocaba la falta de normalidad en la distribución de los datos.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Diagnóstico de leptospirosis bovina

El estudio incluyó 56 vacas, 32 de un parto, 12 de dos, 8 de tres y 4 de 3 partos; serológicamente positivos a *Leptospira* spp. 48.2 y 51.8% fueron clasificadas como de riesgo alto y medio a leptospirosis bovina, respectivamente. Inicialmente, 64 vacas recibieron tratamiento, después de los resultados serológicos y de la valoración de acuerdo con el cuadro 2.1, 8 casos con clasificación de riesgo bajo se consideraron con un diagnóstico erróneo y fueron excluidos del estudio. Los signos clínicos observados durante el diagnóstico de leptospirosis se presentan en las figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4.

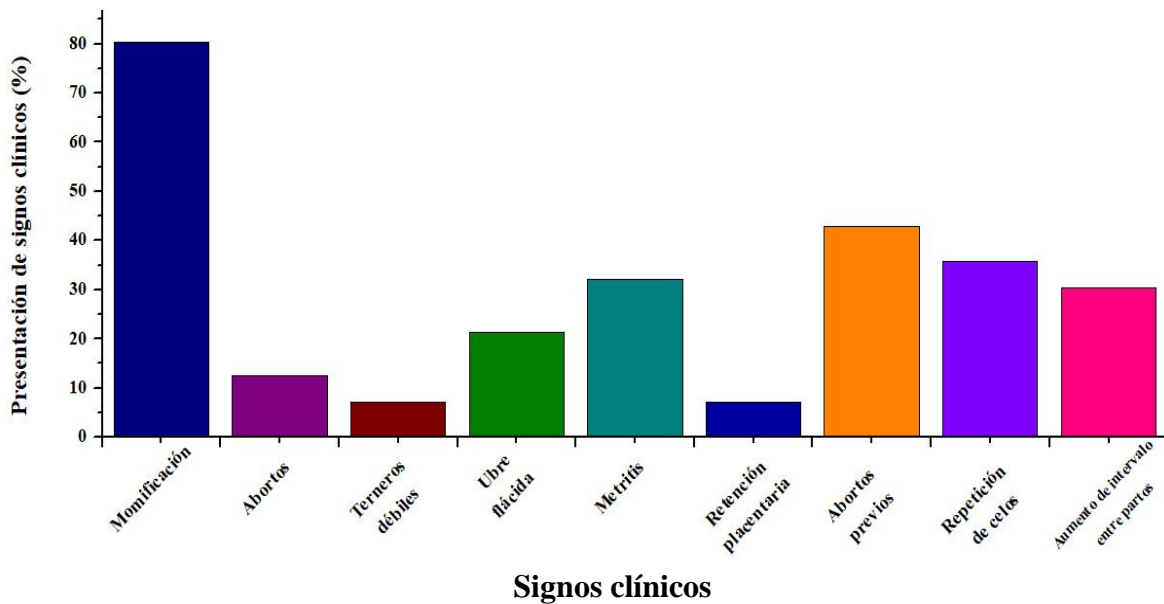


Figura 5.1 Signos clínicos asociados a leptospirosis observados durante el diagnóstico clínico en vacas lecheras



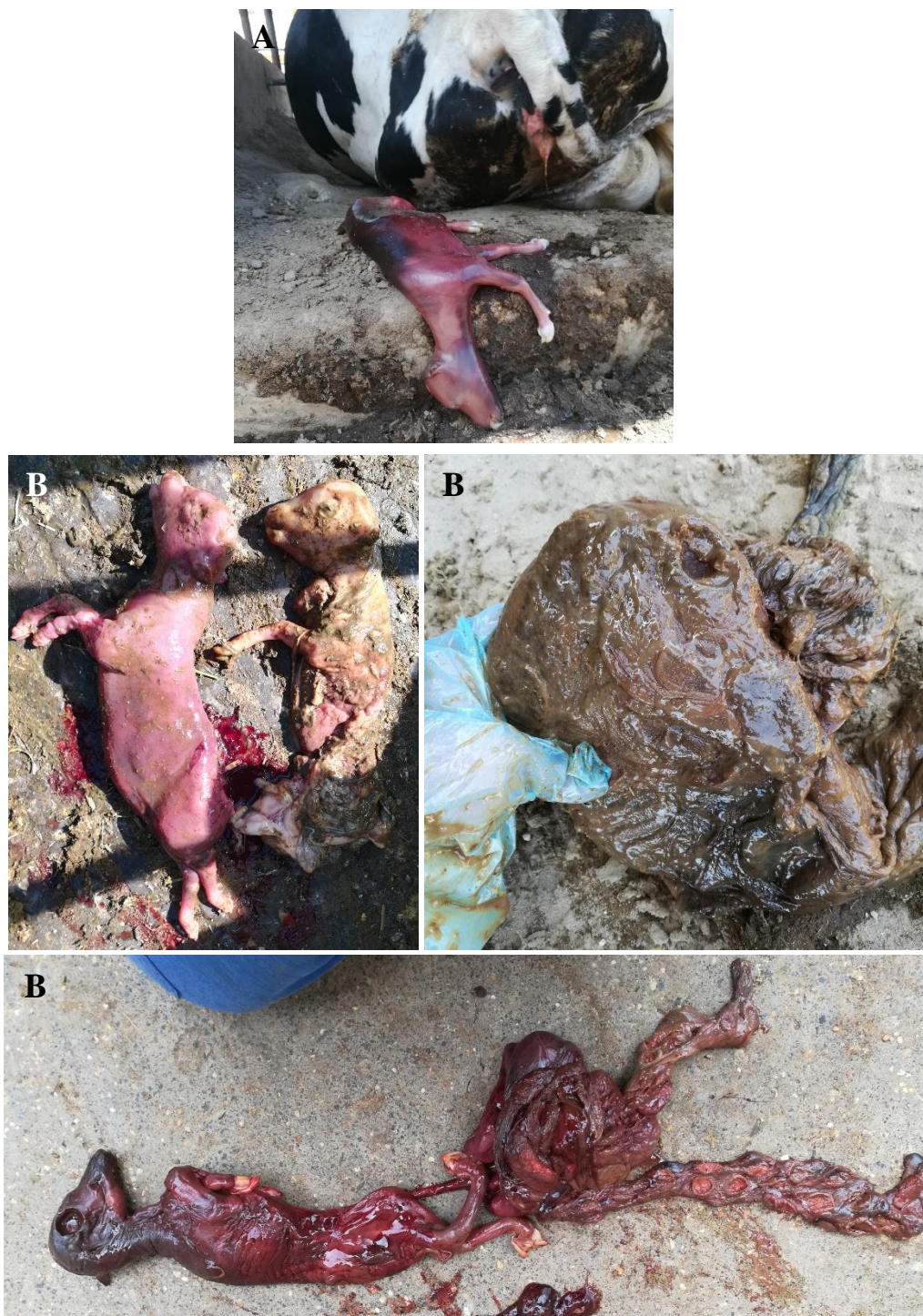


Figura 5.2 (A) Aborto y (B) momificaciones en vacas positivas por serología a *Leptospira* spp mediante la prueba de microaglutinación microscópica (MAT)





Figura 5.3 Becerros nacidos débiles en vacas positivas serológicamente a *Leptospira* spp



Figura 5.4 Retención placentaria en vacas positivas serológicamente a *Leptospira* spp

## 5.2 Resolución de parámetros reproductivos después del tratamiento con Enro-C

El cuadro 5.1 resume algunos parámetros reproductivos afectados por leptospirosis y su resolución después del tratamiento con Enro-C. En las variables metritis y retención placentaria, se consideraron los días desde su aparición hasta el primer servicio, estos datos fueron comparados con otros reportes con tratamientos diferentes. El resto de las variables

reproductivas observadas fueron contrastadas con valores de referencia reportados como ideales en un hato. 45 días después de ser inseminadas se confirmó gestación con ayuda de un experto en reproducción, obteniendo así un total de 100% de gestación en vacas tratadas con un promedio de 1.8 dosis por concepción.

Cuadro 5.1 Parámetros reproductivos después del tratamiento con Enro-C

| <b>Variable reproductiva</b>   | <b>Promedio ± DE</b> | <b>Valores de referencia<sup>1-7</sup></b> |
|--|----------------------|--|
| Resolución de metritis (días)  | 57 ± 21.53           | 80.5-104.6‡                                |
| Resolución de retención placentaria (días)                                       | 48.75 ± 11           | 92-158‡                                    |
| Intervalo del aborto/parto/tratamiento de momificación al estro (días)           | 39 ± 15.42           | < 45                                       |
| Intervalo del aborto/parto/tratamiento de momificación al primer servicio (días) | 47 ± 20.76           | 65-70                                      |
| Intervalo del primer servicio a concepción (días)                                | 22.5 + 34.49         | 20-30                                      |
| Inseminaciones por concepción (dosis)  | 1.88 ± 1.03          | < 2  |
| Total de vacas gestantes (%)   | 100%                 | 88†  |

†Preñez general por hato

‡ Reportes de casos con diferentes tratamientos

Goshen y Shipigel, 2006<sup>1</sup>; Drillich et al., 2007<sup>2</sup> Galina y Valencia, 2008<sup>3</sup>; Hernández, 2009<sup>4</sup>; Rangel et al., 2009<sup>5</sup>; Armengol y Fraile, 2015<sup>6</sup>; Mellado et al., 2017<sup>7</sup>

### 5.3 Casos positivos a serovariedades de *Leptospira* sp y disminución de anticuerpos antileptospirales después del tratamiento con Enro-C

El 89.3% de las vacas fueron reactivas a más de una serovariedad, de las 12 contenidas en el panel de antígenos. Las serovariedades más frecuentes fueron Bratislava, Canicola, Hardjo y Pomona (Figura 5.5). 28-35 días después del tratamiento, el total de animales positivos diagnosticados mediante MAT se redujo en 9 de las 12 serovariedades probadas (Figura 5.6), el promedio de los títulos de anticuerpos se redujo en todas las serovariedades, esta reducción estadísticamente significativa se muestra en la Cuadro 5.2.

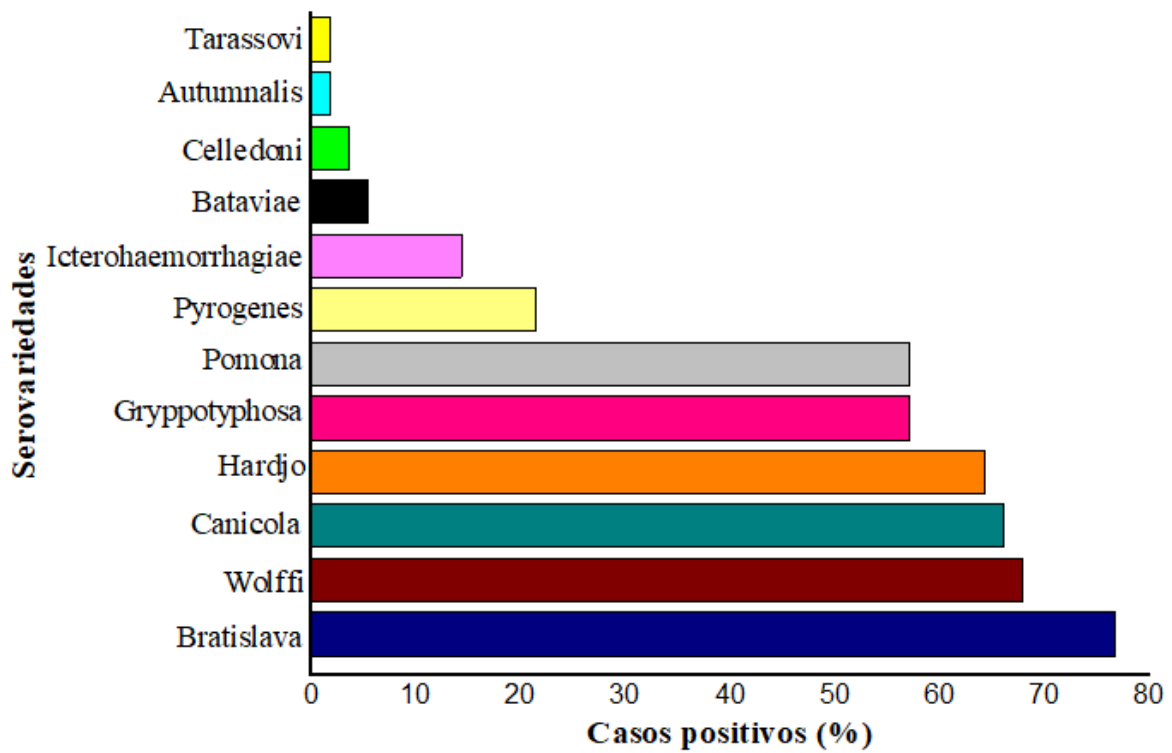
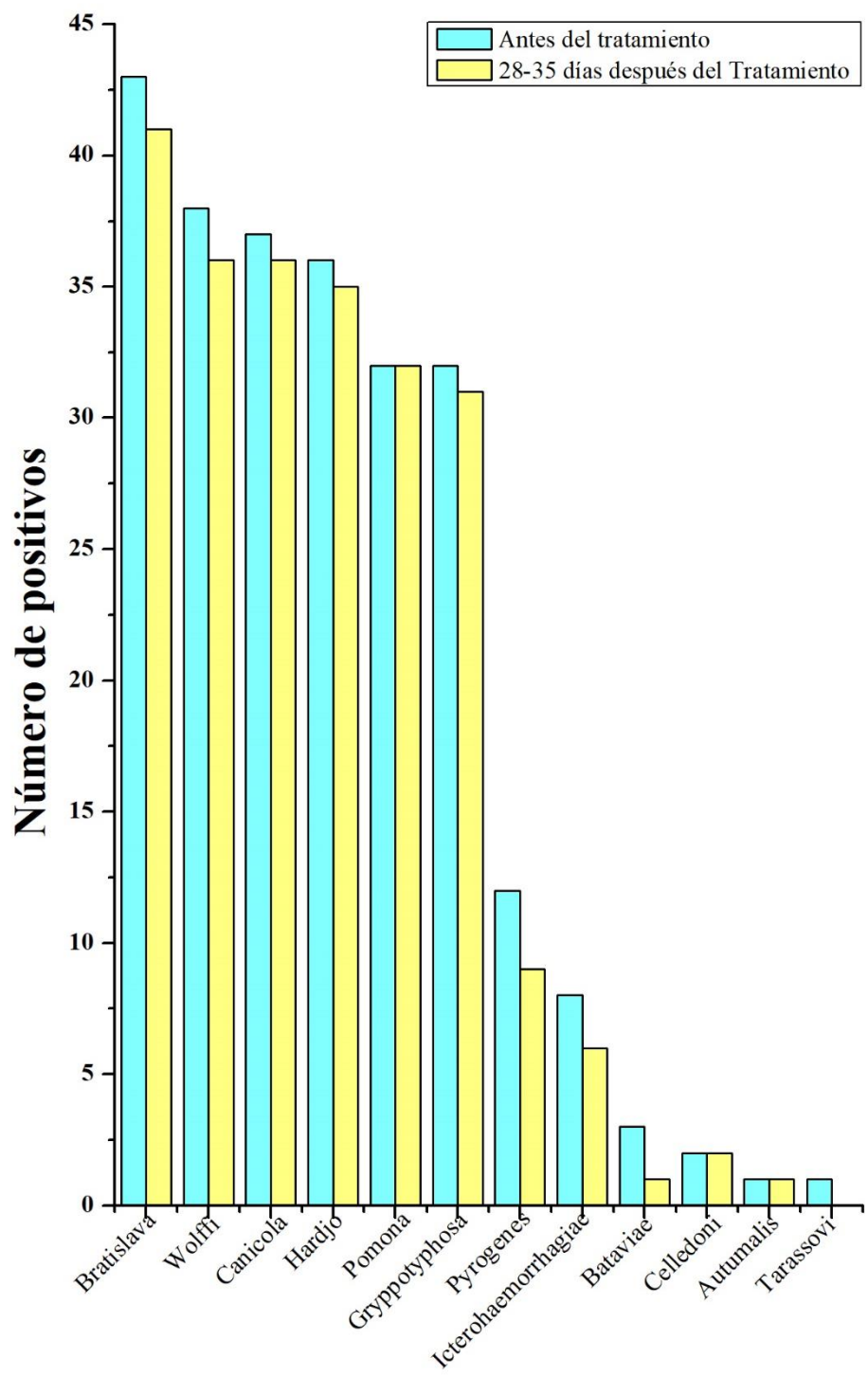


Figura 5.5 Proporción de las serovariedades diagnosticadas mediante MAT, de muestras de suero de vacas con leptospirosis crónica



### Serovariedades

Figura 5.6 Número de animales positivos a serovariedades probadas, antes y después del tratamiento con Enro-C

Cuadro 5.2 Promedio de títulos de anticuerpos antileptospira antes y 28-35 días después del tratamiento con Enro-C

| <b>Títulos de anticuerpos antileptospira</b> |                                    |
|--|------------------------------------|
| Antes del tratamiento                        | 28-35 días después del tratamiento |
| $453.5 \pm 79.51^a$                          | $233 \pm 69.323^b$                 |

<sup>a, b</sup> Diferentes literales dentro de la misma fila muestra diferencia estadística significativa  $P < 0.05$

## IV. DISCUSIÓN

La leptospirosis bovina es una de las enfermedades que mayormente afecta la producción bovina, en los intentos por controlar la enfermedad, han sido probados diferentes antibacterianos (Alt et al., 2001; Suepaul et al., 2015). Sin embargo, carecen de una eficacia clínica bien definida. Aunado a esto, los tratamientos comúnmente utilizados no siempre están disponibles. Por ejemplo, actualmente no existe una presentación comercial en México dirigido al tratamiento de leptospirosis en bovinos basado en dihidroestreptomocina/estreptomicina como antibacteriano de elección (Martins y Lilenbaum, 2017).

Debido a las condiciones ambientales ideales para la sobrevivencia y diseminación de *Leptospira* spp. en la región (Moles et al., 2002; Luna et al., 2005) y en los establos donde se realizó el estudio, no fue posible el aislamiento de los animales durante el tratamiento (Alexander y Rule, 1986; Truccolo et al., 2002). Por tanto se instauró en lo posible algunas medidas de higiene y manejo como, mejorar las condiciones de higiene en la zona de alojamiento y evitar encharcamientos, mantener limpia el área de alimentación, evitar el contacto de las vacas con otros animales posibles portadores, control de fauna nociva, principalmente roedores, separación de animales tratados, limpieza y desinfección de sala de ordeño (Fávero et al., 2017; Martins y Lilenbaum, 2017) para disminuir los riesgos de reinfección y diseminación de la enfermedad (Guerra, 2013). Tampoco fue posible establecer un grupo control no tratado por cuestiones éticas (Paulus et al., 2013; Kramer y Front, 2017), o un grupo tratado con otro antibacteriano, debido a que después de informar al productor el costo del tratamiento, tiempos de retiro y probabilidad de cura clínica y beneficios potenciales, entre otros, optaron por Enro-C a diferencia de estreptomicina, el antibacteriano de elección hasta la fecha, solo o en combinación con  $\beta$ -lactámicos. La decisión fue reforzada después de resultados parciales en el tratamiento (Gerritsen et al., 1993; Alt et al., 2001).

Los signos clínicos mostrados en la figura 3.1, han sido asociados a leptospirosis en el ganado durante la fase aguda y/o crónica (Divers y Peek, 2008; Smith, 2015), y confirmados durante la infección por *Leptospira* spp. (Mori et al., 2017). La leptospirosis es una de las principales enfermedades reproductivas del ganado bovino, la forma crónica y subclínica es común y

con frecuencia subdiagnosticada (Carmona-Gasca et al., 2011), ocasionando pérdidas por abortos, mortinatos, nacimiento de terneros débiles, infertilidad, entre otros, que se reflejan en los parámetros reproductivos de un hato (Atxaerandio et al., 2005; Grooms, 2006; Carmona-Gasca et al., 2011). Los parámetros reproductivos después del tratamiento con Enro-C muestran valores considerados ideales para un establo; la resolución de metritis en 57 días promedio en comparación a casi dos veces el tiempo, desde su aparición hasta el primer servicio, cuando se utilizó amoxicilina parenteral o en combinación con oxitetraciclina intrauterina y, clortretaciclina intrauterina como tratamiento (Gosehn y Shpigel, 2006; Armengol y Lorenzo, 2015). El tiempo desde la retención placentaria hasta el primer servicio, muestra un patrón similar al comparar Enro-C con ceftiofur, ampicilina, y ampicilina con cloxacilina (Drillich et al., 2005; Mellado et al., 2017). El resto de los parámetros del cuadro 3.1 son considerados ideales según Galina y Valencia (2008) y Hernández (2009) después del uso de la Enro-C. Todas las vacas tratadas fueron diagnosticadas gestantes, mediante palpación rectal. Es importante enfatizar que todas las vacas del estudio eran consideradas “vacas problema” en el establo, con altas probabilidades a ser desechadas.

La inmunización como parte del control, es una medida de suma importancia, sin embargo, los reportes indican que la protección se limita a las serovariedades relacionadas durante un tiempo corto (Bolin y Alt, 2001; Brown et al., 2003; Talpada et al, 2003; Adler y Peña-Moctezuma, 2010). Las bacterinas utilizadas para la inmunización de las vacas en este estudio corresponden a 27 con Bacterina UAM (Hardjo, Wolffi, Pomona, Icterohaemorrhagie, Tarassovi, Gryppothyphosa), 9 con Leptoferm<sup>®</sup> (Pomona, Hardjo, Gryppothyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola) 7 con Pentalev<sup>®</sup> (Hardjo, Tarassovi, Wolffi), 4 con Leptos10<sup>®</sup> (Hardjo, Bataviae, Canicola, Ictrohaemorrhagiae, Tarassovi, Wolffi, Ballum, Gryppothyphosa, Pomona) y 3 con Spirovac<sup>®</sup> (Canicola, Gryppothyphosa, Ictrohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo); las 6 vacas restantes no estaban inmunizadas. En este sentido, en las no inmunizadas, títulos de anticuerpos >200 a una o más serovariedades se consideraron positivos; las previamente inmunizadas, títulos >400 se consideraron positivas y >200 en serovariedades no contenidas en la bacterina (Adler y Peña-Moctezuma, 2010; OIE, 2014; Pinto et al., 2016). El diagnóstico serológico en vacas inmunizadas se hizo por lo menos 90 días después de la inmunización, tiempo en que los títulos de anticuerpos han disminuido después de la utilización de bacterinas polivalentes (Bolin y Alt, 2001) y que se

encuentran por debajo de 200 (Bolin y Alt, 2001). La Figura 3.2 muestra las serovariedades observadas en este estudio, las cuales previamente han sido reportados en otras partes del mundo (Atxaerandio et al., 2005, Grooms 2006; Rinehart et al., 2012; Ellis, 2015; Fávero, 2017); todas con capacidad de generar enfermedad y asociadas a problemas reproductivos en bovinos (Bolin, 2001; Atxaerandio et al., 2005; Grooms 2006; Divers y Peek, 2008; Smith, 2010; Rinehart et al., 2012; Ellis, 2015). El 89.3% de las vacas fueron reactivas a más de una serovariedad y de éstas, el 55.9 a más de 5, esto puede ser explicado por la convivencia de las vacas con otros mamíferos posibles portadores de *Leptospira* spp., además de las condiciones de manejo e higiene deficiente en los establos, lo que favorece la transmisión (Hartskeerl et al., 2011; Fávero et al., 2017; Martins y Lilenbaum, 2017). 28-35 días después de finalizado el tratamiento con Enro-C, 11 de las 12 serovariedades disminuyeron los títulos de anticuerpos y en 9 disminuyeron el número de animales positivos. El promedio de títulos de anticuerpos contra *Leptospira* spp., fue estadísticamente menor después del tratamiento. Si bien no se logró una disminución total de los títulos de anticuerpos en los casos positivos a las serovariedades de leptospira, excepto Tarassovi. La tendencia en la disminución de anticuerpos podría asociarse a una disminución de la carga bacteriana o a la ausencia de esta, según lo que obtuvieron Carrascosa et al. (2017) en un modelo de hámster.

Es importante mencionar que la dosis probada para el tratamiento de leptospirosis ha sido previamente sustentada con estudios PK/PD en bovinos, con una probabilidad de eficacia clínica cerca del 90% al inyectar 15 o 20 mg/kg de Enro-C contra infecciones causadas por *Leptospira* spp. con una  $CMI_{90} < 1.0 \mu\text{g/ml}$  (Mendoza et al., 2018).

En conclusión, el tratamiento de Enro-C a dosis de 15 mg/kg corrigió los signos clínicos reproductivos referidos a leptospirosis, mejorando la eficiencia reproductiva. Se sugiere que la disminución de títulos de anticuerpos generados por *Leptospira* spp. es en respuesta al efecto del tratamiento. Es necesario realizar pruebas confirmatorias de la presencia del patógeno en orina mediante PCR y así poder descartar el estado de portador.



## V. REFERENCIAS

Adler, B., (2014) “Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects” *Veterinary Microbiology*, 172, pp. 353-358. doi: 10.1016 / j.vetmic.2014.06.015

Adler, B. y Peña Moctezuma, A., (2010). “Leptospira and leptospirosis” *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4), pp. 287-296. doi: 10.1016 / j.vetmic.2009.03.012

Alexander, AD. y Rule PL., (1986) “Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30 (6), pp. 835-839. doi: 10.1128 / aac.30.6.835

Alt, DP.; Zuerner, R. L. y Bolin, C. A., (2001) “Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219 (5), pp. 636-639. doi: 10.2460 / javma.2001.219.636

Armengol, R. y Lorenzo, F., (2015) “Comparison of two treatment strategies for cows with metritis in high-risk lactating dairy cows” *Theriogenology*, 83; pp. 1344-1351. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.024>

Asín-Prieto, E.; Rodríguez-Gascón, A. y Arantxazu, I., (2015) “Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents” *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21 (5), pp. 319-329. doi: 10.1016/j.jiac.2015.02.001

Atxaerandio, R. et al., (2005) “Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain” *Veterinary Record*, 156, pp. 376-380. doi: 10.1136/vr.156.12.376

Babaahmady, E. y Khosravi, A., (2011) “Toxicology of baytril (enrofloxacin)” *African. Journal Pharmacy and Pharmacology*, 5 (18), pp. 2042-2045. doi: 10.5897/AJPP11.644

Barnett, JK. et al., (1998) “Expresion and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters” *Infection and Immunity*, 67 (2), pp. 853-861. doi: 0019-9567/99/\$04.0010

Bolin, CA. y Alt, DP., (2001) “Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo” *American Journal of Veterinary Research*, 62 (7), pp. 995-1000. doi: 1556-6811/11/\$12.00 doi:10.1128/CVI.00288-10

Brown, RA. et al., (2003) “Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo” *Vaccine*, 21 (27-30), pp. 4448-58. doi: 10.1016 / s0264-410x (03) 00439-0

Callan, R., (2010) “Enfermedades del sistema renal” Smith B. (ed) *Medicina Interna de Grandes Especies*. Edición 4ª. Barcelona, Elsevier.

Cameron, C., (2015) “Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism” Adler, B. (ed.) *Leptospira and Leptospirosis*. Australia, Springer.

Canut, A. et al., (2015) “Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis in microbiology: a tool for the evaluation of the antimicrobial treatment” *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33 (1), pp. 48-57. doi: 10.1016/j.eimc.2013.04.023

Carmona-Gasca, CA. et al., (2011) “Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública” *Revista Veterinaria México*, 42 (4), pp. 277-288.

Carrascosa A. et al., (2015) “Serum pharmacokinetics and tissue concentrations of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride-dihydrate in hamsters” *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.*, 39, pp. 661-667. doi: 10.3906/vet-1504-104

Carrascosa, A. et al., (2017) “Efficacy of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride-dihydrate against leptospirosis in a Hamster model” *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 61 (11), pp. e01285-17.

Cortese VS. et al., (2014) “Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves” *American Journal of Veterinary Research*, 75 (5), 507–512. doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.75.5.507>

Costa, F. et al., (2015) “Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A systematic review” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), pp. 1-19. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

Divers, T. y Peek, S., (2008) *Rebhun’s diseases of dairy cattle*. Edición 2a. Missouri, Elsevier.

Drillich, M. Klever, N. y Heuwleser, W., (2007) “Comparison of Two Management Strategies for Retained Fetal Membranes on Small Dairy Farms in Germany” *Journal of Dairy Science*, 90, 4275-4281. doi: 10.3168/jds.2007-0131

Dudley, MN., (2003) “Quinolones and eukaryotic topoisomerases” Hooper DC. y Rubinstein E. (ed.) *Quinolone antimicrobial agents*, 3a. edición, Washington, ASM Press.

Ellis W., (2015) “Animal Leptospirosis” Adler, B. (ed.) *Leptospira and Leptospirosis*. Australia, Springer.

Escamilla HP. et al., (2007) “Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico” *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 71, pp. 314-317.

Fang F. et al., (2014) “Interlaboratory and between-specimen comparisons of diagnostic tests for leptospirosis in sheep and cattle” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26 (6), pp. 734-47.

Fávero JF. et al., (2017) “Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation” *Microbial Pathogenesis*, 107(1), pp. 149-154.

Galina, C. y Valencia, J., (2008) *Reproducción de animales domésticos*. Edición 3ª. México, Limusa.

Gerritsen, MJ. Koopmans, MJ. y Olyhoek, T., (1993) “Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype hardjobovis in experimentally infected cows” *Veterinary Microbiology*, 38(1-2), pp. 129-138.

Gootz, TD. y Osheroff, N., (2003) “Quinolones and eukaryotic topoisomerases” Hooper DC. y Rubinstein E. (ed.) *Quinolone antimicrobial agents*, 3a. edición, Washington, ASM Press.

Goris, M. y Hartskeerl, RA. (2014) “Leptospirosis Serodiagnosis by the Microscopic Agglutination Test” *Current protocols in microbiology*, 32, pp. 12E.5.1-12E.5.18.

Goshen, T. y Shpigel, NY., (2006) “Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows” *Theriogenology*, 66, pp. 2210-2218.

Griffith, ME. et al., (2007) “Efficacy of fluoroquinolones against *Leptospira interrogans* in a hamster model” *Antimicrobial, Agents and Chemotherapy*, 51(7), pp. 2615-2617.

Grooms, DL., (2006) “Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis” *Theriogenology*, 66(3), pp. 624-628.

Guerra, MA., (2013) “Leptospirosis: Public health perspectives” *Biologicals*, 41 (5), pp. 295-297.

Guerrero H. et al., (2001) “Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans” *Infection and Immunity*, 69 (8), pp. 4958-4968.

Guerrero, H. et al., (2015) “Physicochemical characterization and pharmacokinetics in broilers chickens of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride dihydrate” *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38, pp. 183-189. doi: 10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001

Haake, D. et al., (1998) “Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection” *Infection and Immunity*, 66 (4), pp. 1579-1587.

Hanson, T. et al., (2003) “A mixture model for bovine abortion and foetal survival” *Statistics in medicine*, 22 (10), pp. 1725-39. doi: 10.1002/sim.1376

Hartskeerl, RA., Collares-Pereira, M. y Ellis, WA., (2011) “Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world” *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (4), pp. 494-501. doi: 10.1111 / j.1469-0691.2011.03474.x.

Hawkey, P., (2003) “Mechanisms of quinolone action and microbial response” *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51, Suppl. SI, pp. 29-35.

Hernández, J., (2009) “Parámetros reproductivos en vacas lecheras” Porras AI. y Páramo RM. (ed.) *Manual de prácticas de reproducción animal*, México, DR<sup>©</sup> Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández-Rodríguez, P. et al., (2011) “A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines” *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), pp. 1-7.

INEGI., (2017). “Anuario estadístico y geográfico de Hidalgo 2017” *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. [En línea] México, disponible en: [http://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF\\_Docs/HGO\\_ANUARIO\\_PDF.pdf](http://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF_Docs/HGO_ANUARIO_PDF.pdf) [Accesado el día 9 de octubre de 2019]

Kitamura, Y. et al., (2014) “A proposal of a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index map for selecting an optimal PK/PD index from conventional indices (AUC/MIC,

Cmax/MIC, and TAM) for antibiotics” *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 29 (6): 455-62.

Ko, AI. Goarant, C. y Picardeau, M., (2009) “Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for and emerging zoonotic pathogen” *Nature Reviews Microbiology*, 7 (10), pp. 736-747.

Kramer M, Font E. Reducción del tamaño de la muestra en experimentos con animales: controles históricos y estrategias relacionadas. *Biol Rev.* (2015) 92: 431–45. doi: 10.1111 / brv.12237

Lau CL., et al., (2010) “Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire?” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104, pp. 631-638.

Lehmann JS. et al., (2014) “Leptospiral Pathogenomics” *Pathogens*, 3(2), pp. 280-308.

Levett, P., (2001) “Leptospirosis” *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2), 296-326.

Martínez, M. McDermott, P. y Walker R., (2006) “Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals” *The Veterinary Journal*, 171 (1), pp.10.28.

Martínez-Cortés, I. et al., (2016) “Plasma and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph” *Medycyna Weterynaryjna*, 72, pp. 686-692.

Martins, G. y Lilenbaum, W., (2017) “Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment” *Research in Veterinary Science*, 112, pp. 156-160.

Mellado, M. et al., (2017) “The effects of four protocols for the treatment of retained placenta on reproduction performance and milk yield in Holstein cows” *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68, pp. 513-520.

Mendoza, J. et al., (2018), “Pharmacokinetics of enrofloxacin HCL-2H2O (Enro-C), PK/PD and Monte Carlo Modeling vs. Leptospira spp. in cows” *Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics*, 42 (3), pp. 300-308.

Meri, T. et al., (2005) “Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires” *Microbial Pathogenesis*, 39(4), pp. 139-147.

Miotto, BA. et al., (2018). “Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains” *BMC Veterinary Research*, 14(222), pp. 2-9.

Miranda-Calderón, J. et al., (2014) “Enrofloxacin hydrochloride dihydrate” *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 70 (4), pp. o468-o469.

Mughini-Gras, L. et al., (2014) “Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds” *Epidemiology and Infection*, 142(6), pp. 1172-1181.

Mullan, S. y Panwala, TH., (2016) “Polymerase Chain Reaction: An important tool for early diagnosis of leptospirosis cases” *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(12), pp. 8-11.

Musso, D. y La Scola, B., (2013) “Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge” *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(4), pp. 245-252.

OIE, (2014),” Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals” OIE Terrestrial Manual. Paris: OIE. <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

Palaniappan, RU., Ramanujam, S. y Chang, YF., (2007) “Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis” *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(3), pp. 284-292.

Papich, MG., (2014) “Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs” *Veterinary Microbiology*, 171, pp. 3-4.

Paulus J, Dahabreh I, Balk E, Avendano E, Lau J, Ip S. Oportunidades y desafíos en el uso de estudios sin un grupo de control en revisiones comparativas de efectividad. *Métodos de sintetizador de res* . (2013) 5: 152–61. doi: 10.1002 / jrsm.1101

Picardeau, M., (2013) “Diagnosis and epidemiology of leptospirosis” *Médecine et maladies infectieuses*, 43 (1), pp. 1-9.

Pinto S. et al., (2016) “A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America” *Tropical Animal Health Production*, 48(2), pp. 239-248.

Plumb, DC., (2008) *Vetrinary Drug Handbook*. Edición 6a. Iowa, Blackwell Publishing.

Raghavan, UM. Subbupoongothai, R. y Yung-Fu, C., (2007) “Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis” *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20, pp. 284-292.

Ramos, CF. Souza, GN. Lilenbaum, W., (2006) “Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil” *Theriogenology*, 66 1021-1026.

Rangel, LE, (2009) *Manual de Prácticas de Reproducción animal*. México, DR<sup>©</sup> UNAM

Rinehart, CL. et al., (2012) “Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type hardjo-bovis” *American Journal of Veterinary Research*, 73 (5), pp. 735-740.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). “Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999., (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” *Diario Oficial* [En línea] México, disponible en: [www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/o62ZOO](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/o62ZOO)

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2004) “Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos” *Diario Oficial* [En línea] México, disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/202293/Modificaci\\_n\\_C\\_NOM-012-ZOO-1993\\_270104.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/202293/Modificaci_n_C_NOM-012-ZOO-1993_270104.pdf) [Accesado el día 25 septiembre de 2019]

Sanhueza, JM., et al., (2018) “Meta-analysis of the efficacy of *Leptospira* serovar Hardjo vaccines to preven urinary shedding in cattle” *Preventive Veterinary Medicine*, 153, pp. 71-76.

Savjani, KT. Gajjar, AK. y Savjani, JK., (2012) “Drug solubility: Importance and Enhancement Techniques” *ISRN Pharmaceutics*, 2012, pp. 1-10.

Smith, BP., (2010) *Medicina interna de grandes animales*. Edición 4a. España, Elsevier.

Suepaul, SM. et al., (2015). “Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* isolates from dogs and rats to 12 antimicrobial agents” *Tropical Biomedicine*, 32(1), pp. 1-10.

Sumano, H. Ocampo, L. y Gutiérrez, L., (2015) *Farmacología Veterinaria*. Edición 4a. México, Oralia Hernández Argumedo.

Sumano, H. et al., (2018) “Pharmacokinetics of enrofloxacin HCl-2H<sub>2</sub>O (Enro-C) in dogs and PK/PD Monte Carlo simulations against *Leptospira* spp.” *Journal of Veterinary Science*, 19 (5), pp. 600-607.

Talpada, MD. et al., (2003) “Prevalence of Leptospiral Infection in Texas Cattle: Implications for Transmission to Humans” *Vector-Borne and Zoonotic diseases*, 3 (3), pp. 141-147.

Truccolo, J. et al., (2002) “Quantitative PCR Assay To Evaluate Ampicillin, Ofloxacin, and Doxycycline for Treatment of Experimental Leptospirosis” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4 (3); pp. 848-853.

Viveros, M., et al., (2017) “Efficacy assessment of an intramammary treatment with a new recrystallized enrofloxacin vs ceftiofur and parenteral enrofloxacin in dairy cows with nonsevere clinical mastitis” *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41 (1), pp. e1-e9.

Werts, C., et al., (2001) “Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism” *Nature immunology*, 2 (4), pp. 346-352. DOI: 10.1038/86354

World Health Organization, (2003). “Human leptospirosis. Guidance for diagnosis, surveillance and control” en *WHO Library Cataloguing* [ En línea ] Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf) [Accesado el día 09 de abril de 2019].

World Health Organization, (2011). “Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group” en *WHO Library Cataloguing* [ En línea ] Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/WHO-Second-LERG-2011.pdf> [Accesado el día 09 de abril de 2019].

Zimmerman AD. et al., (2013) “Immunity in heifers 12 months after vaccination with a multivalent vaccine containing a United States *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo isolate” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242 (11), pp. 1573-77.

Zuerner, RL. et al., (2011) “A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization” *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(4), pp. 684-691.