



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**FARMACOCINÉTICA DE LA ENROFLOXACINA CLORHIDRATO
DIHIDRATO (ENRO-C) EN VACAS. MODELAJE MONTE CARLO EN EL
TRATAMIENTO DE LEPTOSPIROSIS CON ENRO-C Y CONSIDERACIONES
DE CURA BACTERIOLÓGICA EN ANIMALES AFECTADOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CORAZÓN DE JESÚS MENDOZA BAUTISTA

TUTOR

HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR

JOSÉ ÁNGEL GUADALUPE GUTIÉRREZ PABELLO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE DE 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres, Palemón y Teresa

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Fisiología y Farmacología por permitirme realizar este proyecto durante estos años.

Al mi tutor, el Dr. Héctor Sumano López por su paciencia y dedicación durante mi formación. Sobre todo, por esa calidez humana y sencillez que lo caracteriza.

A mi comité tutor, el Dr. José Ángel Gutierrez Pabello y la Dra. María Josefa Bernad por las acertadas aportaciones y consejos. Fueron una guía muy valiosa en la realización de este proyecto.

A la Dra. Lilia Gutierrez por su invaluable ayuda, enseñanzas y tiempo que me dedicó.

A mis amigos, compañeros y todo aquel que de alguna manera contribuyó a la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto y mi permanencia en el programa.

RESUMEN

En la primera fase se determinaron en vacas la farmacocinética y las relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) de la enrofloxacin HCl-2H₂O (enro-C), y la enrofloxacin de referencia (enro-R) mediante modelaje Monte Carlo. Cincuenta y cuatro vacas Jersey distribuidas en seis grupos recibieron una sola dosis IM de 10, 15 o 20 mg/kg de enro-C (enro-C₁₀, enro-C₁₅ y enro-C₂₀) o enro-R. La enrofloxacin se determinó por cromatografía líquida de alta resolución. Las proporciones PK/PD establecidas fueron $C_{MAX}/CMI = 10$ y $AUC_{0-24}/CMI = 125$ para el modelaje Monte Carlo. Se establecieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) contra *Leptospira* spp. a partir de valores compuestos. La C_{MAX} de enro-C y enro-R obtenida fue de 6,17 y 2,46; 8,75 y 3,54; y 13,89 y 4,25 µg/mL respectivamente. Las relaciones C_{MAX}/MIC_{90} fueron 6.17 y 2.46, 8.75 y 3.54, y 13.89 y 4.25 para enro-C y enro-R. Las simulaciones de Monte Carlo basadas en $C_{MAX}/MIC_{90} = 10$ indican que solo enro-C₁₅ y enro-C₂₀ pueden ser útiles para tratar la leptospirosis, prediciendo una tasa de éxito $\geq 95\%$ cuando $MIC_{50} = 0.5$ µg/mL y $\geq 80\%$ cuando $MIC_{90} = 1,0$ µg/mL. En una segunda fase, en dos escenarios distintos (altiplano y sureste de México), ciento cuarenta y tres vacas recibieron 15 mg/kg de enro-C IM/5días (enro-C₁ y enro-C₂) o 25 mg/kg de estreptomycin IM/3días (estreptomycin₁ y estreptomycin₂) para el tratamiento de leptospirosis. Los Títulos de anticuerpos antileptospira se determinaron por microaglutinación (MAT) antes del tratamiento y 28 días posteriores a este. Los signos clínicos reproductivos se corrigieron satisfactoriamente obteniendo un porcentaje de vacas gestantes de 86.53 y 88.88% para enro-C, y 79.06 y 87.5% para estreptomycin 1 y 2 respectivamente. Es necesario implementar pruebas específicas para determinar la ausencia de *Leptospira*. Esto ratificaría la eficacia de enro-C que por elevado volumen de distribución y acceso intracelular, es posible que logre curas bacteriológicas amén de las clínicas observadas. Los resultados en este estudio sugieren considerar a enro-C como una opción viable en el tratamiento de esta enfermedad.

Palabras clave: vacas, enro-C, enrofloxacin, leptospirosis, PK/PD

ABSTRACT

In the first phase, the pharmacokinetics, the pharmacokinetic/pharmacodynamic ratio (PK/PD), of enrofloxacin HCl-2H₂O (enro-C) and the reference enrofloxacin (enro-R) were determined by Monte Carlo modeling in cows. Fifty-four Jersey cows distributed in six groups received a single IM dose of 10, 15, or 20 mg/kg of enro-C (enro-C₁₀, enro-C₁₅, and enro-C₂₀) or enro-R. Enrofloxacin was determined by high-performance liquid chromatography. The PK/PD ratios established were $C_{MAX}/MIC = 10$ and $AUC_{0-24}/MIC = 125$ for Monte Carlo modeling. Minimum inhibitory concentrations (MIC) against *Leptospira* were established from compound values. The C_{MAX} of enro-C and enro-R obtained was 6.17 and 2.46; 8.75 and 3.54; and 13.89 and 4.25 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The C_{MAX}/MIC_{90} ratios were 6.17 and 2.46, 8.75 and 3.54, and 13.89 and 4.25 for enro-C and enro-R. Monte Carlo simulations based on $C_{MAX}/MIC_{90} = 10$ indicate that only enro-C₁₅ and enro-C₂₀ may be useful to treat leptospirosis, predicting a success rate $\geq 95\%$ when $MIC_{50} = 0.5 \mu\text{g/mL}$ and $\geq 80\%$ when $MIC_{90} = 1.0 \mu\text{g/mL}$. In a second phase, in two different settings (plateau and southeast of Mexico), one hundred and forty-three cows received 15 mg/kg of enro-C IM/5 days (enro-C₁ and enro-C₂) or 25 mg/kg of streptomycin IM/3 days (streptomycin₁ and streptomycin₂) for the treatment of leptospirosis. Anti-leptospira antibody titers are determined by microagglutination (MAT) before treatment and 28 days after treatment. The reproductive clinical signs were satisfactorily corrected obtaining a percentage of pregnant cows of 86.53 and 88.88% for enro-C, and 79.06 and 87.5% for streptomycin 1 and 2 respectively. It is necessary to implement specific tests to determine the elimination of *Leptospira*. This would ratify the efficacy of enro-C that due to its high volume of distribution and intracellular access, it may achieve bacteriological cures in addition to the observed clinics. The results of this study suggest considering enro-C as a viable option in the treatment of this disease.

Keywords: cows, enro-C, enrofloxacin, leptospirosis, PK/PD

CONTENIDO

	Página	
I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Leptospirosis bovina	1
1.2	Factores de virulencia y patogénesis	2
1.3	Diagnóstico	6
1.4	Control	9
1.4.1	Vacunación	10
1.4.2	Manejo ambiental	10
1.4.3	Terapia antibiótica	11
1.5	Simulaciones Monte Carlo como herramienta en la optimización de terapia antimicrobiana	12
1.6	Enrofloxacin	14
1.7	Relación PK/PD de enrofloxacin	15
1.8	Enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C)	16
1.9	JUSTIFICACIÓN	18
	HIPÓTESIS	19
	OBJETIVOS	20
II	MATERIAL Y MÉTODOS	21
2.1	Estudio Farmacocinético	21
2.1.1	Diseño experimental	21
2.1.2	Determinación de concentraciones de enrofloxacin	22
2.2	Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de enrofloxacin frente a <i>Leptospira</i> spp.	23
2.3	Integración de las variables Farmacocinéticas/Farmacodinámicas a simulaciones Monte Carlo	24
2.4	Implementación de tratamientos en animales afectados	25
2.4.1	Diseño experimental	26
2.4.2	Determinación de títulos de anticuerpos frente a <i>Leptospira</i> spp.	27
2.4.3	Tratamiento	27
2.5	Análisis estadístico	29
III	RESULTADOS	30
IV	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
VI	REFERENCIAS	44

LISTA DE CUADROS

	Página
2.1 Sistema de puntuación para determinar el riesgo final de una vaca a padecer leptospirosis de acuerdo a los signos clínicos y los títulos de anticuerpos contra <i>Leptospira</i> spp. mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT).	27
3.1 Variables farmacocinéticas determinadas de concentraciones séricas de vacas después de la administración IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin de referencia (enro-R)	32
3.2 Valores compuestos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de enrofloxacin contra <i>Leptospira</i> spp; CMI ₅₀ = 0.5 µg/mL and CMI ₉₀ = 1.0 µg/mL.	33
3.3 Relación Farmacocinética/Farmacodinamia (PK/PD) de la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin de referencia (enro-R)	33
3.4 Títulos de anticuerpos obtenidos mediante aglutinación microscópica (MAT) de muestras de vacas afectadas por <i>Leptospira</i> spp., y tratadas con enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o estreptomycin más penicilina G procaínica IM (estreptomycin/penicilina) y 28 días después de finalizado el tratamiento en dos escenarios geográficos, en altiplano (1) y trópico (2).	36
3.5 Valores medios ±1DE de parametros reproductivos observados hasta el día 90 despues de finalizar el tratamiento IM con 15/kg mg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o 25 mg/kg de estreptomycin/penicilina G procaínica en la resolución de signos clínicos atribuibles a leptospirosis en bovinos. Se presentan dos escenarios geográficos: altiplano con vacas Holstein Friesian y tropico con vacas F1 cruza de Cebú x Holstein Friesian y Cebú x Pardo Suizo.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.1 Estructura molecular de la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) obtenida mediante difracción de rayos-X	17
3.1 Perfiles séricos de enrofloxacin en vacas después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg / kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o la enrofloxacin de referencia (enro-R).	31
3.2 Probabilidad de lograr el objetivo $C_{MAX}/CMI=10$ después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y enrofloxacin de referencia (enro-R) vs valores de concentración mínima inhibitoria de <i>Leptospira</i> spp.	34
3.3 Probabilidad de lograr el objetivo $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$ después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin-clorhidrato dihidrato (enro-C) y enrofloxacin de referencia (enro-R) vs valores de concentraciones mínimas inhibitorias de <i>Leptospira</i> spp.	35

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Leptospirosis bovina

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de afección sistémica en mamíferos domésticos y silvestres, y el humano. Es causada por espiroquetas del género *Leptospira*, la cual está integrada por 35 especies (Thibeaux *et al.*, 2018) divididas en tres grandes clados evolutivos, determinado mediante secuenciación de genes de 16S rRNA, y que los clasifica de acuerdo a la virulencia en: patógenos, intermedios y saprófitos (Guglielmini *et al.*, 2019). El grupo patógeno incluye a *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. alexandari*, *L. interrogans*, *L. alstoni*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii* y *L. kmetyi*, mientras los intermedios se integran por *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii*, *L. licerasiae* y *L. inadai* (Chin *et al.*, 2020). La leptospirosis es causada por los clados patógenos e intermedios. Los saprófitos se consideran bacterias ambientales no patógenas que carecen de los factores de virulencia de los clados anteriores (Ricaldi *et al.*, 2012; Guglielmini *et al.*, 2019). Las 35 especies están organizados en 25 serogrupos y más de 300 serovares basados en la heterogeneidad estructural de lipolisacáridos (LPS) en la membrana externa (Guernier *et al.*, 2018; Guglielmini *et al.*, 2019).

Es de distribución mundial, endémica de regiones tropicales y de alta frecuencia en regiones subtropicales (Costa *et al.*, 2015). Las características climatológicas de estas regiones tales como, alta frecuencia de precipitación pluvial, temperaturas cálidas y pH del suelo favorecen la sobrevivencia de *Leptospira* y la preservación de su patogenicidad durante largos periodos (Martins *et al.*, 2010; Andre-Fontaine *et al.*, 2015). La distribución y los patrones de infección en estas áreas geográficas varían de acuerdo a la adaptación de los serovares, a los hospedadores locales, así como por los cambios climáticos y ecológicos (Hartskeerl *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2016).

La enfermedad la causan principalmente *Leptospira interrogans* y *borgpetersenii* serovar Hardjo (hardjoprajitno y hardjobovis respectivamente). Sin embargo, serovares como Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa (Fávero *et al.*, 2017), Australis, Autumnalis,

Pyrogenes (Delooz *et al.* 2018), Tarasovi y Javanica (Fang *et al.*, 2015; Monte *et al.*, 2015) están asociadas a la presencia de signos clínicos. Las leptospiras del serovar Hardjo se transmite de una vaca a otra mediante contacto directo con orina u otros fluidos o tejidos de animales infectados (Pinto *et al.*, 2017); otros serovares se transmiten al animal vía mucosas (boca, nariz y ojos) mediante contacto con agua y alimento contaminado. Este mecanismo de transmisión es esencial para infecciones incidentales, donde otras especies domésticas y silvestres actúan como reservorios (Martins & Lilembaum, 2017). Además, *Leptospira* spp. posee adaptaciones que permiten su supervivencia dentro y fuera del huésped, lo que la convierten en colonizadores exitosos tanto en el huésped como en el medio ambiente (Levett, 2001).

1.2 Factores de virulencia y patogénesis

Después de ingresar al organismo mediante cortaduras o abrasiones, las leptospiras patógenas e intermedios se multiplican en la zona de entrada durante un periodo de incubación que puede durar de 2 a 20 días. Posterior a la fase de incubación, entran en el torrente sanguíneo a través de vasos linfáticos o directamente en los vasos, donde sobreviven a la muerte por el sistema del complemento sérico y se diseminan en el torrente sanguíneo hacia todo el organismo, alcanzando órganos diana como hígado, pulmón y riñón, donde sobrevivirán y multiplicarán durante varios meses, esta fase bacterémica dura de 4 a 7 días. A menudo con fiebre y otros signos sistémicos en animales con afección clínica (Smith, 2010; Fernandes *et al.*, 2016).

Durante la fase de convalecencia, las leptospiras se alojan en glándula mamaria, riñón, aparato genital. Dependiendo de la virulencia del serovar, la infección renal crónica genera cambios fisiológicos, una nefritis intersticial leve o nefritis intersticial difusa, intensa o linfocitaria acompañada de fibrosis (Smith, 2010). La infección crónica en el riñón y aparato reproductor permite la trasmisión del microorganismo mediante la orina, secreciones uterinas y vaginales, placenta, tejidos fetales y semen (Smith, 2010; Loureiro & Lilenbaum, 2020). Durante la infección crónica, *Leptospira* reside en la luz de los túbulos

renales proximales donde está protegida de los fagocitos y los anticuerpos humorales. La bacteria no estimula ninguna respuesta inmunitaria mientras esté localizada en la luz del túbulo proximal. Por lo tanto, los títulos de anticuerpos séricos disminuyen, incluso se vuelven negativos aunque el riñón esté afectado y eliminado bacterias (Smith, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2018).

El resultado de la infección depende en gran medida del tamaño del inóculo, la inmunidad del huésped y los factores de virulencia de *Leptospira*, y son los que determinan fuertemente la presentación grave (Chin *et al.*, 2020).

La presentación aguda grave es poco común y coincide con la fase de leptospiremia en becerros infectados por leptospiras del serogrupo Pomona e Icterohaemorrhagiae. Se caracteriza por signos como anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, ocasionalmente meningitis y muerte (Ellis, 2015; Louleiro & Lilenbaum, 2020).

La presentación subclínica esta asociada a la infección por el serovar Hardjo, se caracteriza por una disminución repentina de la producción, ubre de tipo flácida, leche de apariencia amarilla con coágulos de sangre y alto recuento de células somáticas. La mayoría de las vacas regresan a producción normal después de 10-14 días. Con frecuencia estos cambios pasan desapercibidos, convirtiéndose en una infección crónica (Ellis, 2015) con trastornos reproductivos. El aborto en el último tercio de gestación es el signo más común en este tipo de infección (Louleiro & Lilenbaum, 2020). Sin embargo, la infertilidad, momificación fetal, nacimiento de terneros débiles, muerte embrionaria y nacimientos prematuros, son alteraciones reproductivas que también se presentan (Zuerner *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2017; Fávero *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018).

Los factores asociados con la virulencia de varias especies de *Leptospira* con frecuencia son proteínas de superficie que median la interacción entre la bacteria y los tejidos del huésped. A pesar de que los factores de virulencia son estudiados extensamente, las contribuciones reales a la virulencia aún no se conocen plenamente.

La movilidad es un mecanismo que contribuye a la virulencia de las leptospiras, ocurre por la actividad de dos flagelos que se insertan subterminalmente en el periplasma en cada polo

de la célula sin superponerse (Murray, 2015). La rotación del endoflagelum rígido y superenrollado en el periplasma dobla a la bacteria, deformándola para darles extremos característicos en forma de gancho o en forma de espiral. La rotación flagelar y al mismo tiempo el giro de la célula en dirección opuesta causa el impulso de la bacteria produciendo la traslación (Picardeau, 2017; Li *et al.*, 2000). La dirección de rotación flagelar se adaptan según las condiciones ambientales y está influenciado por quimiorreceptores ubicados en los polos celulares, cerca del motor flagelar, que le sirve a la bacteria para la detección de sustratos, respondiendo a una amplia gama de estímulos químicos, aunque se desconoce el ligando para cada receptor. La hemoglobina es un fuerte atrayente químico, lo que sugiere que *Leptospira* es atraído en el huésped en el lugar de la lesión, donde ya se han degradado las barreras tisulares (Murray, 2015; Picardeau, 2017). De manera similar, la atracción al piruvato y tween 80 dirigen el movimiento hacia fuentes de ácidos grasos. Después de la invasión bacteriana la quimiotaxis puede ser no necesaria. Sin embargo, es de suponerse la importancia que tiene en el tropismo tisular (Murray, 2015).

La adhesión de las leptospiras a las células del huésped y a los componentes de la matriz extracelular (MEC) es un paso inicial primordial para la diseminación y persistencia de las leptospiras en los tejidos durante la infección y patogénesis (Evangelista & Coburn, 2010). Existen diferentes proteínas de *L. interrogans* con capacidad de unión a MEC, Colágeno tipo I y IV, fibronectina celular y plasmática, lo que indica la múltiple adhesión a distintas moléculas (Fernandes *et al.*, 2016). Entre ellas, LSa24 o LfhA y a su parálogo LenA con sus homólogos LenB, LenC, LenD, LenE y LenF con fuerte unión a la lámina. Otras proteínas son: Lsa 20, Lsa25, Lsa26, Lsa27 y Lsa33, con unión exclusiva a láminas de componentes de MEC. Lsa21 y LipL53 tienen un espectro amplio de adhesión que incluye la interacción con lámina de MEC, colágeno tipo IV y fibronectina plasmática y celular (Fernandes *et al.*, 2016). Las adhesinas Lig A y B se unen a MEC e interactúan con fibronectina, colágeno I y IV, además LigB interactúa con colágeno tipo III, elastina y tropoelastina (Choy *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2016). Otras adhesinas de superficie externa que se asocian con invasión y diseminación bacteriana son: Loa22, OmpL1, OmpL36, OmpL37, OmpL47, OmpL54, Lsa63, LipL45 (Picardeau, 2017).

LipL32 es una lipoproteína que tiene la capacidad de unirse selectivamente a componentes individuales de la lámina y colágeno I y IV, muestra unión a la fibronectina plasmática, estrechamente relacionado a hemólisis (Hoke *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009; Evangelista & Coburn, 2010). Su alta expresión durante la infección, conservación en especies patógenas y ausentes en saprófitas, y su inmunogenicidad son consistentes con un papel importante en la patogénesis.

La unión e interacción de la bacteria al plasminógeno contribuye a la diseminación inicial en el huésped. Una vez unida, *Leptospira* tiene la capacidad de capturar plasminógeno en su superficie externa y mediante un activador exógeno lo convierte en plasmina, lo que aumenta su poder proteolítico y capacidad de degradar MEC, fibronectina y lámina, favoreciendo su penetración e invasión (Vieira *et al.*, 2009). Es importante señalar que sólo las leptospiras patógenas tienen la capacidad de adquirir plasminógeno del plasma, lo que sugiere fuertemente la importancia en la virulencia. Además, las leptospiras recubiertas de plasmina interfieren con la disposición de C3b e IgG sobre la superficie bacteriana, probablemente mediante la degradación de estos componentes, disminuye el proceso de opsonización. La disminución de opsonización y fagocitosis constituye un mecanismo por el cual *Leptospira* escapa del sistema inmune hasta alcanzar un ambiente inmunológico seguro, confiriéndole algunas ventajas de evasión durante la infección (Fernandes *et al.*, 2016).

La unión de *Leptospira* a fibrinógeno ocurre de manera directa mediante proteínas de unión a fibrinógeno o a través de la degradación de superficie asociada a la actividad de plasminógeno. Esta unión permite el incremento en el consumo de moléculas de fibrina y por consecuencia hay una disminución de coágulos de fibrina, lo que facilita la hemorragia y diseminación bacteriana (Fernandes *et al.*, 2016). Esto se manifiesta en el huésped en forma de hemorragia, trombosis o ambas. Las hemorragias petequiales son extensas, hay necrosis hemorrágica en músculo esquelético, arteritis coronaria y hemorragia pulmonar, la cual es una complicación causada por el daño al endotelio vascular atribuible a una toxina, ya que a menudo las leptospiras no se detectan en el sitio de la lesión (Wagenaar *et al.*, 2007).

Las esfingomielinasas leptospirales Sph1, Sph2, Sph3 y SphH, así como de sus parálogos HlyX, HlpA, TlyA son hemolisinas detectadas en cepas patógenas, están potencialmente involucradas en aspectos de la patogénesis en la célula huésped, incluida la invasión tisular, daño endotelial, evasión inmunitaria y adquisición de nutrientes, principalmente ácidos grasos de las membranas celulares del huésped (Narayanavari *et al.*, 2012). La lisis celular por las hemolisinas es importante en la adquisición de hierro mediante la lisis de eritrocitos. El hemo liberado es transportado al interior de la célula bacteriana mediante la proteína de unión a hemina (HbpA), identificada en *L. interrogans* por Sritharan *et al.*, (2005) (Narayanavari *et al.*, 2015).

1.3 Diagnóstico

Establecer un diagnóstico certero de leptospirosis se vuelve complicado debido a sus signos clínicos inespecíficos. A menudo estos signos se confunden con los causados por varios patógenos. Por lo tanto, el diagnóstico clínico resulta ser inapropiado e insuficiente y el apoyo de pruebas de laboratorio para la confirmación es indispensable (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011). El diagnóstico de laboratorio se basa en el examen de muestras clínicas en busca de la espiroqueta, su aislamiento y cultivo, detección de anticuerpos antileptospirales y la detección de ADN bacteriano (Fang *et al.*, 2014).

La observación directa de leptospiras en muestras de orina y sangre con el microscopio de campo oscuro es un método rápido con una sensibilidad de 10^7 leptospiras/L. Sin embargo, si el número de bacterias es bajo, es posible que no se detecten, además están sujetos a mala interpretación, lo que convierte este, un método no recomendado como procedimiento de rutina (Musso & La Scola, 2013; Marquez *et al.*, 2017). El aislamiento y cultivo de bacterias de muestras de tejido fresco, sangre u orina, sería ideal para confirmar la infección. Sin embargo, éste método resulta laborioso, difícil y se puede tardar hasta 6 meses (Sykes *et al.*, 2011) y con frecuencia el resultado se ve influenciado por la contaminación de otras bacterias y hongos, incluso algunos serovares (*Hardjo bovis*) son inherentemente difíciles de cultivar (Fang *et al.*, 2014; Murphy, 2015).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba de referencia para el serodiagnóstico de leptospirosis tanto en humanos como en animales (WHO, 2003; OIE, 2018). MAT implica la detección de anticuerpos específicos de leptospiras que reconocen el antígeno de cepas conocidas lo que resulta en una aglutinación. La prueba determina el serogrupo, pero no es suficientemente precisa para identificar serovares dentro de un serogrupo dado, así como entre grupos. Es una prueba serológica muy sensible y específica que requiere un panel de cultivos vivos de diferentes serovares de áreas específicas como controles, idealmente debe contener todos los serovares que circulan localmente. Un panel incompleto puede ser responsable de falsos negativos (Musso & La Scola, 2013; Marquez *et al.*, 2017). Alternativamente se pueden utilizar cepas de *Leptospira* de referencia global, recomendadas por WHO (Goris & Hartskeerl, 2014).

La prueba de aglutinación microscópica puede ser positiva desde el día 10 a 12 después del inicio de la enfermedad, lo que confirma una exposición a *Leptospira*. Sin embargo, un resultado positivo no distingue entre una infección activa, un estado de portador o una exposición previa. Por lo tanto, no discrimina entre anticuerpos derivados de la infección o vacunación. Además, La detección de anticuerpos IgG e IgM no permite diferenciar entre infecciones actuales, recientes o pasadas (Musso & La Scola, 2013). Después de la vacunación, la mayoría de los animales tendría títulos de anticuerpos negativos a las 15 semanas. Sin embargo, los anticuerpos pueden persistir hasta 12 meses (Murphy, 2015). En este sentido, para poder diferenciar un resultado positivo de uno negativo se debe establecer un punto de corte, el cual depende de la seroprevalencia. El uso de valores de corte que comienzan en 1:50 y 1:100, pueden ayudar a reducir la posibilidad de reacción cruzada y mejorar la sensibilidad de la prueba. De tal manera que un título de anticuerpos bajo es apropiado en una población en la que la exposición es poco común, pero si la exposición es frecuente, como sucede en áreas tropicales, es necesario un título de corte más alto. (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011; Musso & La Scola, 2013).

El uso de técnicas moleculares como Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es ideal para la detección de la infección por *Leptospira*, ya que es sensible, específico y permite aplicar de manera

confiable a diferentes tipos de muestras incluida la orina y tejidos. Implica la amplificación de un fragmento de genes universales (secuencias específicas de ADN) presentes en leptospiras patógenas, como LipL32, LigA y LigB, lo que permite la identificación de cepas bacterianas (Hamond *et al.*, 2014).

Con el uso de la PCR es posible detectar a la bacteria en sangre en los primeros 5-10 y hasta 15 días después del inicio de la enfermedad, durante la fase de leptospiremia. Después de la segunda semana, la detección debe hacerse en orina durante un tiempo variable (Musso & La Scola, 2013). Un resultado positivo en orina indica una infección aguda o un estado de portador crónico, mientras que un resultado negativo no excluye de leptospirosis, ya que la leptospiuria es transitoria e intermitente (Hamond *et al.*, 2014; Murphy, 2015). Una PCR positiva indica la presencia de leptospiras patógenas en la muestra, pero en ningún caso permite identificar directamente el serovar implicado. Por lo tanto, debe usarse conjuntamente con MAT (Picardeau, 2013).

La qPCR es una modalidad de PCR que permite controlar el progreso de la reacción. La qPCR distingue y mide con precisión las secuencias de ADN específicas de una muestra, incluso si solo hay una cantidad muy pequeña, lo que permite tener resultados cuantitativos al calcular el número de copias de ADN cuando se compara con una curva estándar, lo que determina el número de leptospiras presentes en la muestra (Valasek & Repa, 2005; Hawkins & Guest, 2017).

1.4 Control

Los programas de control de leptospirosis bovina se basan en la interrupción de la transmisión de la infección. Un programa de control debe considerar a serovares implicados, medios de transmisión, factores de riesgo y opciones de posible cura (Ellis, 2015). Por lo que, se necesita de información veraz proveniente de estudios seroepidemiológicos, cultivos de *Leptospira*, prevalencia de la enfermedad, entre otros. Información que comúnmente no están disponibles en las áreas geográficas afectadas.

El control de la enfermedad en ambientes tropicales y subtropicales se torna una situación desafiante e incluso frustrante dado las condiciones favorables para la sobrevivencia bacteriana, además de la gran diversidad de especies de mamíferos silvestres que actúan como reservorios (Faine *et al.*, 2000; Martins & Lilenbaum, 2017).

Los diferentes serovares que se presentan en determinada área geográfica, con frecuencia determinan las medidas a implementar en los programas de control. Las infecciones por serovares adaptadas al ganado como huésped de mantenimiento son independientes de la región y factores ambientales. En este caso, las limitaciones para evitar el contacto entre vacas hacen necesario la implementación de la inmunización. Cuando la infección es incidental, esporádica y puntual, con frecuencia causada por serovares de otras especies domésticas o silvestres, el control se realiza corrigiendo estos factores. Sin embargo, cuando se conjuntan múltiples factores en los que se involucran temporada de lluvias, encharcamiento de agua y manejo deficiente del hato, como ocurren en regiones tropicales, la vacunación es obligatoria (Lilenbaum & Sосуza 2003; Martins & Lilenbaum, 2017). Además de la vacunación, el control incluye la implementación de un manejo ambiental y de la terapia antibiótica selectiva (Ellis, 2015; Martins & Lilenbaum, 2017; Pimenta *et al.*, 2019). Estas medidas son efectivas en brotes en los que el reservorio puede ser identificado. Sin embargo, el control se vuelve más difícil cuando se trata de la enfermedad crónica causada por cepas adaptadas (Louleiro & Lilenbaum, 2020).

1.4.1. Vacunación

La vacunación es el método más fácil y barato en el control de leptospirosis. Es ampliamente utilizada en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, pero no una práctica común en muchos países tropicales (Martins & Lilenbaum, 2017). Su eficacia radica en la prevención de la colonización renal y consecuentemente la eliminación de leptospiras por vía urinaria (Bolin & Alt, 2001).

Las bacterinas utilizadas para la vacunación se basan en preparaciones de células enteras inactivadas o membranas de leptospiras patógenas. De manera general, estos tipos de

bacterinas no inducen protección a la infección a largo plazo y tampoco producen inmunidad cruzada. Es decir, se limita a serovares contenidas en el preparado, dejando sin protección a otros serovares circulantes (Fernandes *et al.*, 2016). No obstante, algunos productos que contienen serovares del mismo grupo tienen protección heteróloga (Cortese *et al.*, 2014, Dib *et al.*, 2014; Ellis, 2015). Por ejemplo, las del grupo sebroe. Con frecuencia las bacterinas son formuladas con cepas de referencia internacional, lo que implica no ser adecuadas para la protección contra infecciones por cepas nativas, especialmente en ambientes tropicales (Martins & Lilenbaum, 2017).

La eficacia de la vacunación es del 80.6 al 94.9% y la capacidad de respuesta inmune está relacionado al número de serovares incluidos en la bacterina (Sanhueza *et al.*, 2018). Las bacterinas mono y bivalentes tienen una mejor y más prolongada protección en comparación a bacterinas con más de tres serovares (Brown *et al.*, 2003).

1.4.2. Manejo ambiental

La implementación de las medidas ambientales y las prácticas de manejo en el hato contribuyen de manera importante en el control de leptospirosis. La subdivisión del hato en lotes pequeños con el fin de evitar el hacinamiento, buen drenaje del suelo en zonas de alojamiento, la limpieza regular de zona y equipos de ordeño, aplicación de medidas de higiene, saneamiento ambiental, eliminación de material de desecho y la restricción de acceso a agua contaminada, reducen significativamente la exposición de los animales a la infección por *Leptospira* spp. (Ellis, 2015, Martins & Lilenbaum, 2017; Pimenta *et al.*, 2019).

La eliminación de roedores y el control de fauna silvestre en el establo, así como la restricción del pastoreo mixto, entre vacas y otras especies domesticas (cerdos, caballos, ovejas, entre otros) posibles portadoras de otros serovares patógenas (Adler & de la Peña-Moctezuma, 2010; Picardeau, 2013) son acciones que contribuyen en el control. La medida de establo cerrado es óptima, pero poco práctico. En esta condición, la implementación de

cuarentenas de animales recientemente introducidos y el aislamiento de los enfermos, es una práctica útil (Ellis, 2015; Mughini-Gras *et al.*, 2014).

1.4.3. Terapia antibiótica

La terapia con antibióticos es una herramienta ampliamente recomendada como parte del programa de control. Su implementación reduce el número de animales infectados, lo que disminuye la eliminación urinaria y transmisión vaca a vaca. Es administrada principalmente para la prevención de abortos y otros problemas reproductivos, y como parte del tratamiento durante el proceso de cuarentena de animales próximos a ingresar al establo (Mughini-Gras *et al.*, 2014, Martins & Lilenbaum, 2017; Liegeon *et al.*, 2018).

Los tratamientos usuales están basados en la combinación de penicilina y estreptomina, tetraciclina, ampicilina y cefalosporinas de tercera generación (Liegeon *et al.*, 2018). La dosis única de estreptomina a 25 mg/kg podría eliminar el estado de portador renal. Sin embargo, algunas infecciones resisten a este protocolo (Gerritsen *et al.*, 1994; Alt *et al.*, 2001), en cuyo caso se recomienda dosis repetidas durante tres días consecutivos (Loureiro & Lilenbaum, 2020). En países donde el uso de estreptomina está prohibido en animales de producción, la oxitetraciclina, tulatromicina y ceftiofur demostraron cierto grado de eficacia en el tratamiento de leptospirosis (Alt, 2001; Cortese *et al.*, 2014). En el caso de que la terapia antibiótica eliminara la infección crónica y el estado de portador renal, no pueden prevenir contra infecciones incidentales o futuras reinfecciones (Martins & Lilenbaum, 2017).

En la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, se probaron diferentes antibióticos incluidas algunas fluoroquinolonas. Ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina y gatifloxacina lograron reducir la mortalidad en hámster cuando se administraron a dosis altas durante la fase de leptospiremia (Griffith *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2017). A pesar de esto, las fluoroquinolonas no son recomendadas en el tratamiento de leptospirosis bovina aun cuando tienen larga vida media, buena disponibilidad y relativamente pocos efectos

adversos lo que permiten un buen régimen de dosificación y fácil tolerancia (Griffith *et al.*, 2007).

1.5 Simulaciones Monte Carlo como herramienta en la optimización de la terapia antibiótica

La simulación Monte Carlo es un modelo matemático desarrollado en la década de 1940 para simular escenarios que requieren la generación de números aleatorios. En esencia, es la generación de objetos o procesos aleatorios por medio de una computadora. Estos objetos son los que podrían surgir naturalmente como parte del modelado de un sistema de la vida real. La idea es repetir el experimento muchas veces para obtener muchas cantidades de interés utilizando la ley de números grandes y otros métodos de inferencia estadística (Kroese *et al.*, 2014; Tennant *et al.*, 2015).

En el contexto de la terapéutica antimicrobiana, las simulaciones Monte Carlo permiten combinar datos farmacocinéticos y microbiológicos para predecir la probabilidad de que un régimen antimicrobiano alcance el objetivo terapéutico, esto se denomina Probabilidad de lograr el objetivo (PTA), en el que el objetivo a alcanzar es un parámetro farmacodinámico óptimo para la destrucción bacteriana (Tennant *et al.*, 2015). Recientemente, se utiliza en el desarrollo de nuevos fármacos, en la optimización de procesos químicos y cada vez con mayor frecuencia, en el diseño de estudios clínicos, en donde se utiliza para crear semejanza *in silico* del mundo real y es útil para predecir la eficacia clínica de las dosis asumidas y los regímenes de dosificación (Bonate, 2000; Yuan *et al.*, 2015).

La eficacia antimicrobiana se puede mejorar optimizando los regímenes antibióticos apegados a los principios Farmacocinéticos/Farmacodinámicos (PK/PD) mediante las simulaciones Monte Carlo, a diferencia del método convencional en las pruebas de dosis, el cual sigue siendo empírico, carente de fundamento científico que demuestre la relación entre la tasa de eficacia y la dosis (Yuan *et al.*, 2015).

La aplicación del análisis PK/PD comienza con la realización de estudios preclínicos, se utilizan datos PK poblacional de la fase 1. Se toma en cuenta la variabilidad individual de la población animal de destino y varias cepas bacterianas que muestran diferentes distribuciones de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en aislados clínicos. Éstos datos PK/PD son sometidos a simulaciones Monte Carlo para confirmar la probabilidad de eficacia de las dosis probadas (Yuan *et al.*, 2015; Bhavnani & Hammel, 2017).

Los resultados de PTA del análisis PK/PD planteados, el cual se basa en objetivos PK/PD no clínicos en las primeras etapas del desarrollo clínico, representan un enfoque razonable para pronosticar la eficacia de los regímenes de dosificación. Datos aceptables para este análisis y que respalda la selección de la dosis, es lograr un objetivo PK/PD de 90% o más en los valores CMI de interés (Trang *et al.*, 2017).

En la selección de regímenes de dosificación optimizados para PK/PD en un estudio clínico, es más difícil determinar las relaciones PK/PD para la eficacia basándose en datos clínicos. Por lo tanto, la evaluación de la PTA utilizando objetivos PK/PD no clínicos, un modelo PK poblacional y las simulaciones, junto con la observación de los pacientes que superaron dichos objetivos, representa un importante paso en la confirmación para la selección de dosis (Trang *et al.*, 2017).

La implementación de las simulaciones Monte Carlo proporciona una estrategia racional para el ajuste oportuno de régimen de dosificación cuando se obtiene datos PK y CMI en el desarrollo de estudios clínicos. Por lo que, el número de animales utilizados en el experimento se puede reducir y evitar el sufrimiento.

1.6 Enrofloxacin

La enrofloxacin es una fluoroquinolona de tercera generación, aprobado por la FDA para su uso en animales. Está indicado para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, urogenitales, cutáneos y del tracto respiratorio en varias especies domésticas, incluidos bovinos, aves, perros y gatos (Idowu *et al.*, 2010; López-Cadenas *et al.*, 2013). La dosis

recomendada en bovinos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias susceptibles es de 2.5 a 5 mg/kg una vez al día durante 3-5 días o bien la dosis única de 7.5-12.5 mg/kg (Plumb, 2008; Riviere & Papich, 2018).

La absorción oral de enrofloxacin en rumiantes es baja, aproximadamente del 10%. Desde la vía subcutánea e intramuscular, la absorción es cercana al 100% usando preparados con un pH no mayor a 10.4 (Sumano *et al.*, 2015), en preparados más alcalinos el tiempo de absorción parece ser afectado por la liberación más lenta generada por la irritación o lesión en el sitio de inyección (Riviere & Papich, 2018). Luego de una inyección intravenosa, su distribución se ajusta a un modelo de dos compartimentos, primero se distribuye de forma rápida en órganos y tejidos más perfundidos y posteriormente a tejidos con menos perfusión. Tiene buena distribución a diversos tejidos con un volumen de distribución área ($V_{d_{area}}$) de 2-4 L (de Lucas *et al.*, 2008; Sumano *et al.*, 2015), lo que indica una eficiente distribución fuera del plasma. Alcanza concentraciones intracelulares moderadamente altas en macrófagos y neutrófilos y tiene un efecto inmunoestimulante (Sumano *et al.*, 2015). Es moderadamente lipofílica y también tiene un flujo de salida más lento de los fagocitos, por lo que, en algunos tejidos como hígado y riñones puede tener concentraciones varias veces más alta que las plasmáticas correspondientes (Riviere & Papich, 2018). La vida media de eliminación ($T^{1/2\beta}$) es de aproximadamente 3 h y ocurre principalmente por excreción renal y biotransformación con excreción biliar. Las rutas metabólicas de biotransformación son dealquilación, glucoronidación, oxidación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperazinilo. La desetilación del grupo etilo del anillo piperazinilo genera la ciprofloxacina, uno de los metabolitos de importancia con efecto antibacteriano. Juntos la enrofloxacin y ciprofloxacina producen un efecto aditivo y pueden potenciar el efecto en comparación con cada fármaco solo (Sumano *et al.*, 2015). Del total de la enrofloxacin administrada por vía intravenosa en bovinos, aproximadamente un 60% se biotransforma en ciprofloxacina (Idowu *et al.*, 2010).

La enrofloxacin es un agente bactericida de amplio espectro, incluye bacterias Gram – y Gram +, micoplasmas y riquetsias (Riviere & Papich, 2018; Coetzee & Apley, 2006). Actúa inhibiendo directamente la síntesis de ADN bacteriano. La inhibición ocurre con la

unión de la enrofloxacin a las subunidades GyrA y GyrB de la enzima ADN girasa o a las subunidades ParC y ParE de la topoisomerasa IV mediante la formación de un puente iónico de agua y metal entre las moléculas de oxígeno en el grupo amino del fármaco y los residuos hidroxilo en la serina o los residuos ácidos en la enzima, mediados por un ion Mg^{+2} (Redgrave *et al.*, 2014), esta unión forma un complejo enrofloxacin-enzima-ADN. La presencia de la enrofloxacin en el complejo afecta las funciones de la enzima ADN girasa, inhibiendo el control de la ruptura de la cadena de ADN y la actividad de unión de la subunidad GyrA evitando así dos superenrollamientos negativos, también bloquea el sitio de unión a ATP de la subunidad GyrB lo que impide la hidrólisis de ATP. En la topoisomerasa IV, mediante la unión a ParC y ParE inhibe la separación del ADN doble y la desvinculación de los cromosomas hijos después de la replicación (Martinez *et al.*, 2006; Fàbrega *et al.*, 2009). Esto evita la progresión de las orquillas de replicación y los complejos de transcripción, lo que conduce a la fragmentación del cromosoma y la muerte celular (Hooper, 2001).

La unión de la enrofloxacin a las enzimas parece estar asociado a la naturaleza de las bacterias, en las Gram -, la enrofloxacin tiene mayor afinidad a ADN girasa, mientras que en las Gram + lo es la topoisomerasa IV (Hawkey, 2003).

1.7 Relación PK/PD de enrofloxacin

Las mediciones Farmacocinéticas/Farmacodinámicas para predecir eficacia de las fluoroquinolonas incluye la relación entre la concentración plasmática máxima y la concentración mínima inhibitoria (C_{MAX}/CMI), y la relación área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC)/CMI. Las cuales están estrechamente relacionadas con la muerte bacteriana (Craig, 2001). Las fluoroquinolonas eliminan a las bacterias más rápidamente cuando las concentraciones están por encima de la CMI del microorganismo objetivo y manifiestan un efecto bactericida persistente de moderado a prolongado. Es decir, a medida que aumenta la concentración, también el efecto bactericida aumenta. Por

lo que son considerados antibacterianos con actividad dependiente de la concentración (Ambrose *et al.*, 2003; McKellar *et al.*, 2004).

Las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas para enrofloxacin contra *Leptospira* spp. varió de 0.10 a 0.5 µg/mL (Kim *et al.*, 2006; Miraglia *et al.*, 2013) y de 1.0 a 4.0 µg/mL (Carrascosa *et al.*, 2015; Miraglia *et al.*, 2013; Liegeon *et al.*, 2018). Las concentraciones plasmáticas máximas (C_{MAX}) reportadas varían de 0.60 a 0.98 µg/mL y el área bajo la curva de concentración de 0-24 h (AUC_{0-24}) de 2.93 a 9.62 µg/mL⁻¹ h⁻¹ a dosis de 5 mg/kg (Kaartinen *et al.*, 1995; de Lucas *et al.*, 2008). Los valores bajos de estas variables farmacocinéticas (PK) claves no cumplirían bien las proporciones Farmacocinéticas/Farmacodinámicas (PK/PD) requeridas para tratar *Leptospira* spp., y explica por qué enrofloxacin no se recomienda en el tratamiento de leptospirosis en bovinos. Esto concuerda con los hallazgos de Carrascosa *et al.*, (2017), quienes no encontraron eficacia en el tratamiento de leptospirosis en el modelo hámster.

La administración de dosis altas es más congruente para cumplir con las relaciones PK/PD establecidas para este fármaco con actividad dependiente de la concentración, es decir, la proporción de la concentración plasmática máxima/concentración mínima inhibitoria (C_{MAX}/CMI) idealmente debería ser $\geq 10-12$ y la proporción de área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo en 24 h (AUC_{0-24}) /CMI debería ser ≥ 125 (Papich, 2007; Kitamura *et al.*, 2014; Asín-Prieto *et al.*, 2015). Desafortunadamente, debido a la falta de bioequivalencia, muchas preparaciones farmacéuticas no logran valores similares de C_{MAX} y AUC_{0-24} (Sumano *et al.*, 2001).

1.8 Enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C)

Una nueva enrofloxacin recristalizada (Figura 1.2.) se caracterizó como clorhidrato-dihidrato (enro-C) (Gutierrez *et al.*, 2015) (Patente MX/a/2013/014605; Instituto Mexicano de la Protección Industrial, Ciudad de México). Este nuevo solvato es más soluble en agua en comparación a la enrofloxacin de referencia. En suspensión tiene un pH de 6.2-6.8.

Martínez-Cortés *et al.*, (2016) obtuvieron valores C_{MAX} y AUC_{0-24} particularmente altos después de la infusión intramamaria en vacas, así como muy buena eficacia en el tratamiento de mastitis (Viveros *et al.*, 2018). En comparación a la enrofloxacin de referencia, enro-C mostró mayor biodisponibilidad oral en pollos (Gutierrez *et al.*, 2015), valores altos de C_{MAX} y AUC_{0-24} después de inyección IM en hámsters (Carrascosa *et al.*, 2015), así también IM y oral en perros (Sumano *et al.*, 2018). En ensayos clínicos usando hámsters como modelo experimental, enro-C fue altamente efectivo en el tratamiento de leptospirosis (Carrascosa *et al.*, 2017). Sumano *et al.*, (2018) sugieren que las relaciones PK/PD y las simulaciones Monte Carlo de valores generados con la inyección IM de enro-C a dosis de 10 mg/kg podrían ser efectivas en el tratamiento de casos clínicos de leptospirosis en perros, lo cual demostraron ser altamente eficaz (Gutierrez *et al.*, 2019).

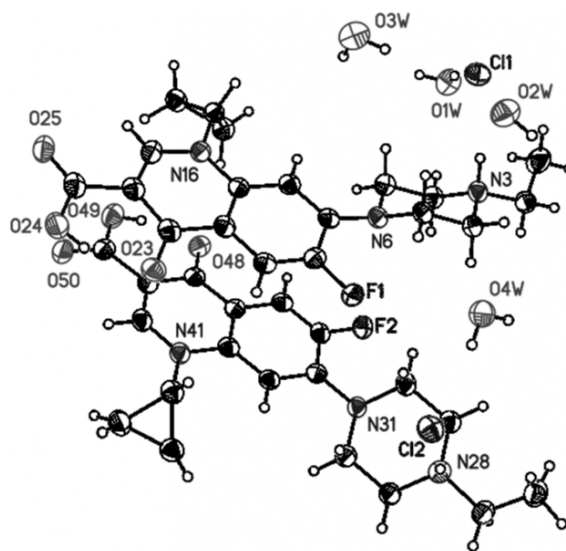


Figura 1.2 Estructura molecular de la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) obtenida mediante difracción de rayos-X (Tomado de Gutierrez *et al.*, 2015).

1.9 JUSTIFICACIÓN

Estudios previos demostraron que la biodisponibilidad de la enro-C es superior a las presentaciones comerciales existentes, a la misma dosis y vía de administración. Aparte, en ensayos preliminares en bovinos se ha visualizado una farmacocinética única de la enro-C con una C_{MAX} superior al requerido en propuestas PK/PD. No obstante, se requiere demostrar su utilidad práctica para garantizar su uso en la terapéutica veterinaria, en particular en la leptospirosis en bovinos. Para ello, es necesario establecer la farmacocinética de la enro-C a dosis habituales (10 mg/kg) y elevadas (15 y 20 mg/kg) en vacas y correlacionar las variables PK clave con los valores CMI de *Leptospira* spp. mediante Simulaciones Monte Carlo, lo que proporcionará racionalidad y certeza de la dosis y la predicción de eficacia de enro-C en el tratamiento de leptospirosis en bovinos.

HIPÓTESIS

La enro-C presenta una farmacocinética tal a dosis de 10 mg/kg, 15 mg/kg y 20 mg/kg por vía IM, que generará variables PK/PD (C_{MAX}/CMI y AUC_{0-24}/CMI) superiores a las de la enrofloxacin de referencia.

Que con la metodología sugerida por NCCLS (*Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines*) es posible generar un panorama epidemiológico de las CMIs necesarias de enrofloxacin para efecto antileptospira (CMI_{90} , CMI_{50}).

Que las relaciones PK/PD de la enro-C en alguna o todas las dosis evaluadas, se pueden integrar a simulaciones Montecarlo para determinar la eficacia teórica, estableciendo una $C_{MAX}/CMI = 10$ y/o una $AUC_{0-24}/CMI = 125$, valores considerados predictores de eficacia.

OBJETIVOS

General

Determinar valores farmacocinéticos de la enro-C para ser integrados a la relación PK/PD contra *Leptospira* spp. mediante modelaje Monte Carlo, que permita sugerir un régimen posológico razonable para ser probado en el tratamiento de leptospirosis bovina.

Específicos

- Definir la farmacocinética de la enro-C y enrofloxacin de referencia (Baytril®) a dosis de 10, 15 y 20 mg/kg vía IM en bovinos, que permitan visualizar concentraciones terapéuticas útiles contra *Leptospira* spp.
- Generar un panorama epidemiológico de las CMI's necesarias para efecto antileptospira mediante metodología sugerida por Clinical & Laboratory standards Institute: CLSI guidelines, y mediante revisión de literatura formal para ser integrado a simulaciones Monte Carlo.
- Integrar las relaciones PK/PD ($C_{MAX} > CMI$ y AUC_{0-24}/CMI) de la enro-C de alguna o todas las dosis evaluadas a modelaje Montecarlo para determinar la eficacia teórica, estableciendo una $C_{MAX}/CMI = 10$ y/o una $AUC_{0-24}/CMI = 125$.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Investigación, Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Oficiales Mexicanas (NOM-062-ZOO-1999 [www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF]).

2.1 Estudio Farmacocinético

El ensayo se realizó en una granja comercial ubicado en el altiplano de la República Mexicana. Se incluyeron cincuenta y cuatro vacas Jersey de 3.5 a 6 años de edad, con un peso medio de 463.5 ± 57.3 kg, clínicamente sanas y sin tratamientos previos con antibióticos. Las vacas se mantuvieron en un espacio de 800 m² y se alimentaron a voluntad con una mezcla de heno molido con alimento concentrado comercial, con un contenido de proteína del 12%. También tenían acceso libre al agua potable durante el día y la noche.

2.1.1 Diseño experimental

Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a través de un generador de números aleatorios en uno de los siguientes seis grupos de nueve vacas cada uno: vacas inyectadas con enro-C a una dosis de 10 mg/kg (enro-C₁₀); vacas con tratamiento similar, pero usando enro-C a 15 mg/kg; y un grupo que recibió 20 mg/kg de enro-C (enro-C₁₅ y enro-C₂₀, respectivamente). Tres grupos fueron inyectados con enrofloxacin de referencia (Bayer® Animal Health S.A de C.V., Ciudad de México) con dosis de 10, 15 y 20 mg/kg (grupos enro-R₁₀, enro-R₁₅ y enro-R₂₀, respectivamente). Los volúmenes de inyección fluctuaron entre 43 y 92 mL. Por lo tanto, el preparado farmacéutico se inyectó por vía intramuscular dividido en volúmenes de 10 mL, primero en las tablas del cuello y luego en los músculos glúteos máximos (primero el lado izquierdo y luego el lado derecho), estableciendo tantos

sitios como fue necesario. Se utilizaron jeringas estériles de 20 mL con agujas hipodérmicas de calibre 18. Después de obtener muestras basales de todas las vacas justo antes de la inyección de los medicamentos antimicrobianos referidos, se obtuvieron muestras de sangre en serie (aproximadamente 7–8 mL muestra) por punción yugular directa a 1, 2, 3, 4, 6, 12, y 24 h utilizando tubos comerciales Vacutainer® de extracción de sangre al vacío. El suero se recuperó por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos, se rotularon y se congeló a -70 ° C, hasta su análisis.

El lote enro-C utilizado fue sintetizado como se describe en la patente mexicana, basado en buenas prácticas de fabricación y de acuerdo con una regulación mexicana (NOM-012-ZOO-1993 [http://www.gob.mx/cms/uploads/adjunto/archivo/202292/NOM-012-ZOO-1993_1701795_orig.pdf]) a partir de enrofloxacin con 99.97% de pureza (Globe Chemicals, México). De esta forma, se obtuvo un polvo blanco fino de estructura cristalina previamente definida (Gutiérrez *et al.*, 2015; Miranda-Calderón *et al.*, 2014). Justo antes de la inyección, los frascos que contenían 10 g de enro-C se suspendieron con 100 mL de agua inyectable estéril mediante agitación vigorosa durante 30s. Esta suspensión inyectable al 10% tenía un pH que oscilaba entre 6.4 y 6.7. La enrofloxacin comercial de referencia utilizada tenía una concentración de 10%.

2.1.2 Determinación de concentraciones de enrofloxacin

La determinación de enrofloxacin en muestras de suero se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en el laboratorio de investigación del departamento de Fisiología y Farmacología. El método se estandarizó según lo descrito por Idowu y Peggins (2004). A 1 mL de alícuota de la muestra de suero se agregó 1 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) y se agitaron en el vórtex, inmediatamente después se centrifugó durante 5 minutos a 5000 g. La fase acuosa se desechó y la fase orgánica se evaporó. El residuo se reconstituyó en la fase móvil de acetonitrilo (ACN): metanol (MEOH): agua (H_2O) (17:3:80) con ácido fosfórico (H_3PO_4) (4% v/v) y trimetilamina (TEA) (4% v/v). El extracto acuoso se colocó en viales para ser analizados. Se utilizó un cromatógrafo de

líquidos (JASCO Analytical Instruments, Easton, MD) con detección UV a 278 nm, una columna y pre columna C18 de 3,5 μm -C18 (Waters Corp, Milford, Mass.) (4,6 mm \times 100 mm). El volumen de inyección fue de 50 μL , la velocidad de flujo de 0,6 mL/min y la temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Los datos se analizaron con el software EASYCHROM 2.0 (Ampersand International Inc, Beachwood, Ohio). Este método cromatográfico fue estandarizado y demostró ser específico para enrofloxacin. El método fue lineal de 0.01 a 20.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y la recuperación se calculó en base a un análisis de regresión lineal ($r^2 = 0.968$). La precisión se demostró por triplicado con un coeficiente de variación entre los días <3.0 . El límite de cuantificación en suero fue de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un límite de detección de 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de enrofloxacin frente a *Leptospira* spp.

Se utilizaron siete cepas de *Leptospira* Interrogans mantenidas a -70°C en leche descremada y glicerol al 5% como crioprotector. Las cepas se descongelaron en baño de agua a 37°C y dos mL se inocularon en 7 mL de medio EMJH y se incubaron a 30°C protegidos de la luz durante siete días. La enrofloxacin que se utilizó tenía un 99.97% de pureza el cual fue comprado a Globe Chemicals (Tlalnepantla, Estado de México, México). El método para la determinación de la CMI fue mediante micro y macrodilución, según lo descrito por Murray y Hospenthal (2004). La prueba de microdilución en caldo se realizó con placas de microtitulación, donde cada placa incluía controles positivos (bacterias sin enrofloxacin), controles negativos (solo medio EMJH) y diluciones en serie dobles de enrofloxacin que van desde 10.24 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e inóculos *Leptospira* spp. en cantidades de 100 μL (2×10^6 UFC/mL). Las placas se incubaron aeróbicamente y se protegieron de la luz a 30°C . Después de 3 días de incubación, se añadieron 20 μL de AlamarBlue a los pocillos. En el quinto día de incubación, se registró el valor de CMI. Para la macrodilución, se hicieron diluciones dobles en serie de enrofloxacin usando las mismas diluciones en serie e inóculos, al igual que el método anterior, pero en un volumen final de 2 mL. Luego, los tubos se incubaron aeróbicamente y se protegieron de la luz a 30°C durante 5 días.

Todos los microorganismos estudiados en este experimento se subcultivaron dos veces en agar Colombia de sangre de oveja al 5% (35 °C durante 16-18 h) antes de la prueba de CMI. *Leptospira* spp. Se mantuvo mediante cultivo continuo en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (Difco, Becton Dickinson and Company, MD, EE. UU.). La concentración de enrofloxacin contenida en el tubo o pozo con la concentración más baja sin crecimiento visual bajo microscopía de campo oscuro se registró como CMI₉₀. Para ambos métodos, *Leptospira interrogans* ATCC 56601 fue la cepa de control de calidad. No hubo variabilidad entre los dos métodos. Los resultados de estos aislamientos se incorporaron a una base de datos compuesta con valores referidos en la literatura.

Para generar un panorama más amplio de CMIs de *Leptospira* spp. contra enrofloxacin, se realizó una búsqueda sistemática en la literatura usando <Enrofloxacin, *Leptospira*, Minimum inhibitory concentration> como palabras clave de búsqueda en las principales bases de datos al que tiene acceso la UNAM, se incluyeron publicaciones en el periodo comprendido de 1995-2018.

2.3. Integración de las variables Farmacocinéticas/Farmacodinámicas a simulaciones Monte Carlo

Se hizo la relación de las variables farmacocinéticas clave C_{MAX}/MIC 50% (MIC₅₀); C_{MAX}/MIC 90% (MIC₉₀); AUC_{0-24}/MIC_{50} y AUC_{0-24}/MIC_{90} . Mediante el software especializado (software Phoenix WinNonlin Certara, NJ, EE. UU.), los datos PK clave de los seis grupos (enro-R₁₀; enro-R₁₅; enro-R₂₀ y enro-C₁₀; enro-C₁₅; enro-C₂₀) se incorporaron a las simulaciones de Monte Carlo basadas en relaciones de lograr los objetivos de $C_{MAX}/MIC = 10$ y $AUC_{0-24}/MIC = 125$, en función de la concentración sérica bactericida óptima.

Se aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Jarque-Bera para asegurar la normalidad de los datos. Se consideró C_{MAX} o AUC_{0-24} como una variable aleatoria (χ) en cada caso para la generación de la función de interés, posteriormente se calculó la probabilidad de éxito a través de 1,000 escenarios con muestras simuladas de tamaño 10, 000 cada uno. Finalmente

se estimó la probabilidad de éxito esperado, $E[\hat{p}]$, para cada valor de CMI y AUC_{0-24} y dosis.

La variable aleatoria de interés es $\chi = C_{MAX}$ o AUC_{0-24} y la función para determinar las probabilidades de éxito está dada por:

$$G(\chi) = \frac{\chi}{MIC}$$

En donde CMI es la concentración mínima inhibitoria para *Leptospira*. Para calcular la probabilidad de éxito se utilizó la condición $G(\chi) = 10$ para C_{MAX} y $G(\chi) = 125$ para AUC_{0-24} .

Para cada escenario con muestra de tamaño 10, 000, la probabilidad estimada de éxito dado un nivel de CMI, $\hat{p} | CMI = m$, está dada por:

$$\hat{p}_{CMI = m} = \frac{\sum_{i=1}^{10,000} I_{G(x) \geq 10}^i}{10,000}$$

En donde la función indicadora se define como:

$$I_{G(x) \geq 10}^i = \begin{cases} 1, & G(x_i) \geq 10 \\ 0, & G(x_i) < 10 \end{cases}$$

Una vez que se determinó la probabilidad de éxito, se construyeron 1,000 escenarios como una muestra suficiente de la población afectada y se hizo una inferencia sobre el valor esperado de la distribución, de la siguiente manera:

$$E_{[p_{CMI = m}]} \rightarrow \hat{p}_{CMI = m} = \frac{1}{1,000} \sum_{j=1}^{1,000} \hat{p}_j$$

2.4 Implementación de tratamientos en animales afectados

Dos grupos de animales fueron incluidos en esta fase del estudio. El primer grupo se ubicó en una unidad especializada en producción de leche; ubicado en el altiplano de México (escenario 1) caracterizado por un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura de 12-16 °C y precipitaciones pluviales de 500-700 mm anuales. En este grupo se incluyeron un total de 105 vacas Holstein-Friesian con un peso promedio de 543 ± 32 kg, de 2 a 5 años de edad. Del total, 13 vacas no habían sido vacunadas contra ningún serovar de *Leptospira*, el resto tenían registros de vacunación contra *Leptospira* spp. Con alguna de las bacterinas comerciales, Spirovac® y Leptosferm-5® (Zoetis, Parsippany, NJ. EE. UU.) y Leptos 10® (Naucalpan de Juárez, Ciudad de México, México). Además, todas las vacas tenían registro de vacunación contra brucelosis, diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina. El manejo reproductivo de estas vacas es mediante inseminación artificial.

El segundo grupo se ubicó en el sureste de México (escenario 2), con un clima cálido y húmedo con abundantes lluvias en verano, temperatura promedio anual de 25 °C, con precipitación anual de 1200-3000 mm, en un sistema de producción de doble propósito, se incluyeron en total de 38 vacas F1 cruza de Cebú x Holstein Friesian y Cebú x Pardo Suizo con un peso promedio de 462 ± 47 kg, de 2 a 6 años de edad. Ninguna de las vacas de este grupo había sido vacunadas contra *Leptospira* spp. En cambio, todas tenían registro de vacunación contra brucelosis. El manejo reproductivo en estas vacas es por monta natural y en menor proporción el uso de inseminación artificial.

2.4.1. Diseño experimental

Se realizó una anamnesis individual completa en vacas de ambos escenarios. Se realizaron exámenes clínicos individuales para determinar su estado clínico al inicio del estudio y así definir su clasificación y si debían ser incluidos de este ensayo. Para evaluar la condición clínica de las pacientes y diagnosticar con certeza que una vaca sufría de leptospirosis, se tomaron en cuenta los signos clínicos más comúnmente asociados con la

leptospirosis, como el aborto reciente, la momificación fetal, la hemoglobinuria, ubre flácida, nacimiento de terneros débiles, mortinatos y disminución de la eficiencia reproductiva, como se describe en el Cuadro 2.1. La puntuación de los signos clínicos en conjunto con los resultados de MAT, permitieron clasificar a las vacas en alta probabilidad de padecer leptospirosis (puntaje de 10-15); probabilidad media (puntaje de 6-9) y baja probabilidad (<5 puntos). Estas últimas vacas fueron excluidas del estudio.

Se consideró como criterio de inclusión a vacas sin inmunización contra *Leptospira* spp., o bien cuya última inmunización tenía más de 60 días atrás. Los criterios de exclusión se basaron en MAT <200 sin vacunación previa y <400 con inmunización, así también vacas clasificadas en riesgo bajo según el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Sistema de puntuación para determinar el riesgo final de una vaca a padecer leptospirosis de acuerdo a los signos clínicos y los títulos de anticuerpos contra *Leptospira* spp. mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT).

Signos clínicos	Puntuación
Aborto	3
Momificación fetal	3
Hemoglobinuria	3
Ubre flácida (Mastitis)	2
Nacimiento de ternero débil o	
Mortinato	2
Historia previa de abortos	1
Infertilidad	1
Aumento de intervalo entre partos	1
MAT	
Con inmunización	
> 1:800	4
1:400	2
1:200	0
1:100	0
Sin inmunización	
>1:400	4
1:200	2
1:100	1
No reactivo	0

Alta probabilidad de padecer leptospirosis (puntaje de 10-15), probabilidad media (puntaje de 6-9) y baja probabilidad (<5 puntos).

2.4.2. Determinación de títulos de anticuerpos frente a *Leptospira* spp.

Se obtuvieron dos muestras de sangre de 7 mL aproximadamente por punción venosa yugular directa en todas las vacas justo antes del tratamiento. El suero obtenido por centrifugación a 2000 g durante dos minutos se envió al laboratorio de microbiología del Departamento de Microbiología e inmunología de la FMVZ UNAM para la determinación de títulos de anticuerpos antileptospira mediante la prueba de microaglutinación (MAT) (Goris y Hartskeerl, 2014). Esto se repitió 28 días después de finalizado el tratamiento. Los serotipos aglutinantes de anticuerpos anti-*Leptospira* para identificar fueron: Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi y Wolffii.

Debido a que los resultados de MAT tomaron aproximadamente 7-15 días para completarse, todas las vacas inicialmente sospechosas fueron tratadas. Sin embargo, como ya se señaló, solo los animales que cumplieron con los criterios de inclusión se registraron en este ensayo.

2.4.3 Tratamiento

Ciento cinco vacas fueron asignadas a los grupos de tratamiento enro-C₁ (56 vacas) y estreptomicina/penicilina₁ (49 vacas) en el escenario 1. Ocho y cinco vacas respectivamente no habían recibido vacunación previa. 38 vacas del escenario 2 fueron asignados a los grupos enro-C₂ (21 vacas) y estreptomicina/penicilina₂ (17 vacas). Las vacas de los grupos enro-C 1 y 2 recibieron 15 mg/kg IM de enrofloxacin clorhidrato dihidrato una vez al día, durante 5 días. Mientras que las vacas de los grupos estreptomicina 1 y 2 fueron inyectadas con el preparado comercial Strepto Bio-Benzipen® (Biozoo, Jalisco, México) a dosis de 25 mg/kg de estreptomicina y 15 000 UI/kg IM penicilina G procaínica, una vez al día durante 3 días.

Enro-C fue preparado bajo el mismo procedimiento previamente referido en el estudio farmacocinético y se administró por inyección IM en una suspensión al 10%. Strepto Bio-

Benzipen® fue administrado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los volúmenes de inyección fluctuaron de 60-90 mL en ambos tratamientos, los sitios de aplicación fueron la tabla del cuello, primero izquierdo y luego a derecho, luego los músculos glúteos en el mismo orden, estableciendo tantos sitios como fue necesario.

Se realizó el seguimiento de los casos clínicos hasta por 90 días posteriores al tratamiento. La corrección de los signos reproductivos junto con un MAT significativamente menor o negativo, se consideraron indicadores de eficacia clínica.

2.4. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas para los parámetros PK obtenidos entre los seis grupos probados se analizaron mediante pruebas ANOVA y Bonferroni de una vía. La diferencia de títulos de anticuerpos antes y después del tratamiento con enro-C y estreptomina/penicilina G procaínica en ambos escenarios se analizó mediante una prueba de t para muestras pareadas. El promedio de anticuerpos se analizó de forma independiente entre tratamientos de cada escenario mediante un análisis de varianza. Se estableció un nivel de significancia de $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa de software SAS versión 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

III. RESULTADOS

Los perfiles séricos de enrofloxacin, ya sea derivado de la inyección IM de enro-C o enro-R a dosis de 10, 15 y 20 mg/kg se muestran en la figura 3.1. Las variables farmacocinéticas correspondientes a cada grupo se muestran en el cuadro 3.1. Los aumentos de dosis produjeron aumentos casi lineales en las variables PK C_{MAX} y AUC_{0-24} en los grupos enro-C y enro-R. El mayor aumento se observó de enro-C₁₅ a enro-C₂₀. Los valores de enro-C fueron estadísticamente superiores en comparación a los de enro-R con la misma dosis ($P < 0.01$ en todos los casos). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar enro-C₁₀ con enro-R₁₅, pero se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa al comparar enro-C₁₀ con enro-R₂₀ ($P < 0.05$).

Los valores de CMI obtenidos en los siete aislamientos fueron los siguientes: 0.062 (1 muestra), 0.25 (1 muestra), 0.5 (4 muestras) y 1.0 µg/mL (1 muestra). Estos valores fueron integrados a los reportados en la literatura, se muestran en el cuadro 3.2. El cuadro 3.3 muestra las relaciones para C_{MAX}/CMI_{50} y C_{MAX}/CMI_{90} , así como AUC_{0-24}/CMI_{50} y AUC_{0-24}/CMI_{90} para los seis grupos.

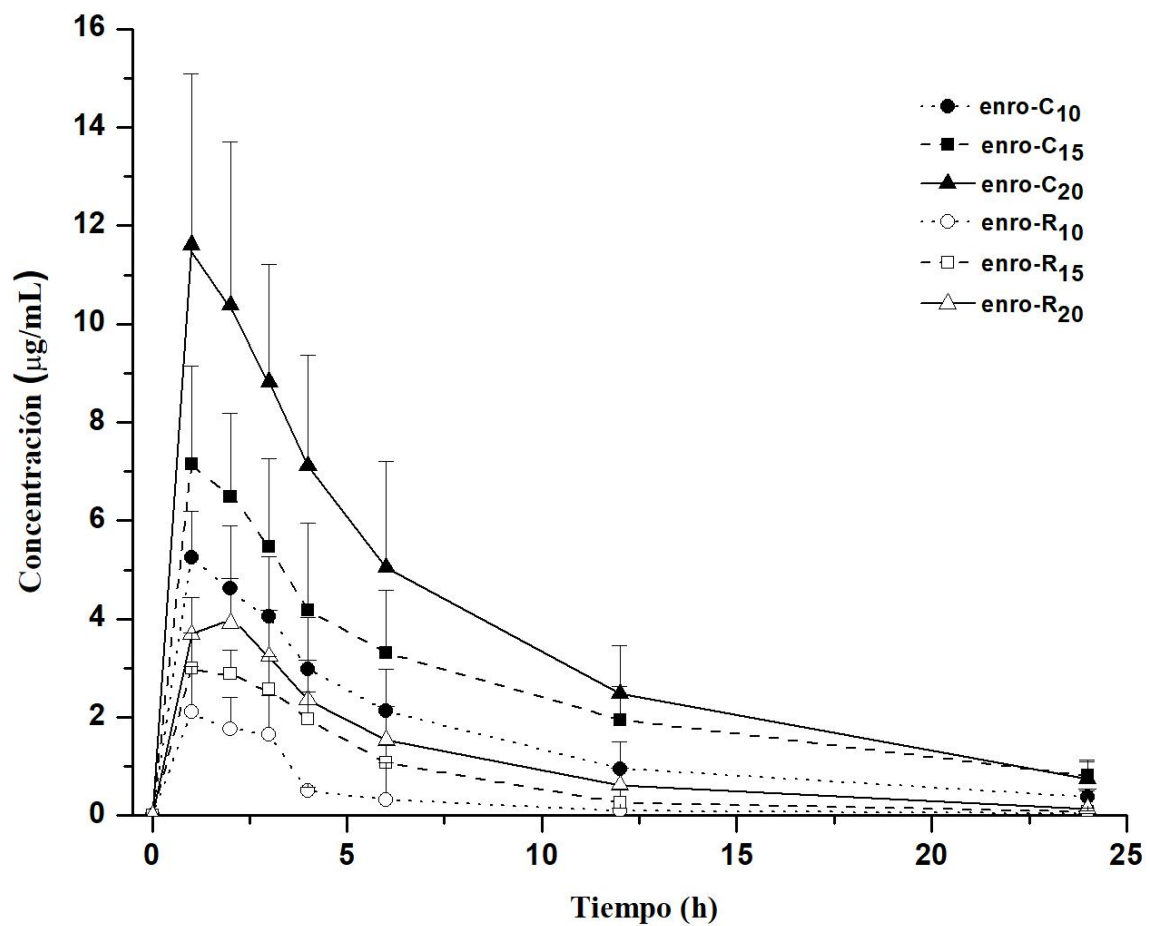


Figura 3.1 Perfiles séricos de enrofloxacin en vacas después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o la enrofloxacin de referencia (enro-R).

Cuadro 3.1 Variables farmacocinéticas determinadas de concentraciones séricas de vacas después de la administración IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin de referencia (enro-R).

Variable	enro-C ₁₀		enro-C ₁₅		enro-C ₂₀		enro-R ₁₀		enro-R ₁₅		enro-R ₂₀	
	Promedio	±DE	Promedio	±DE	Promedio	±DE	Promedio	±DE	Promedio	±DE	Promedio	±DE
C _{MAX} (µg/mL)	6.17 ^{ab}	1.30	8.75 ^b	2.31	13.89 ^c	4.11	2.46 ^d	0.45	3.54 ^{ad}	0.76	4.25 ^{ad}	1.05
T _{MAX} (h)	0.43 ^a	0.73	0.52 ^a	0.66	2.76 ^a	1.53	1.26 ^{ab}	0.27	3.75 ^b	1.35	4.53 ^b	0.77
T _{1/2β} (h)	3.72 ^a	2.05	3.73 ^a	1.92	4.40 ^a	2.29	0.88 ^a	0.18	3.25 ^a	0.98	4.9 ^a	0.97
AUC ₀₋₂₄ (µg/h/mL)	36.71 ^{ab}	18.10	58.72 ^b	21.10	88.61 ^c	31.90	8.83 ^d	2.56	20.35 ^{ad}	4.82	5.15 ^{ad}	9.09
AUC _{0-∞} (µg/h/mL)	34.02 ^{ab}	17.15	53.43 ^a	26.61	74.15 ^c	34.58	8.25 ^d	2.13	20.04 ^b	4.6	24.88 ^b	8.66
AUMC (µg/h ² /mL)	188.50 ^{ab}	161.84	239.18 ^{ab}	144.89	623.20 ^a	436.87	18.65 ^{ab}	13.90	104.44 ^b	39.003	128.46 ^b	69.98
MRT (h)	4.67 ^a	2.11	4.78 ^a	2.08	6.54 ^a	3.16	2.53 ^a	1.09	5.36 ^a	1.32	4.86 ^a	1.43

^{†a,b,c} Diferente literal muestran deferencia estadística significativa P< 0.0001

[‡]n=nueve vacas por cada grupo (36 cows); C_{MAX}= Concentración sérica máxima, T_{MAX}= Tiempo en alcanzar la concentración máxima, AUC₀₋₂₄= Área bajo la curva de concentración sérica vs curva de tiempo en 24 h, AUC_{0-∞}= Área bajo la curva de concentración vs curva de tiempo de 0 al ∞, AUMC_{0-∞}= Área bajo el momento de la curva de 0-∞, MRT= Tiempo medio de residencia.

Cuadro 3.2 Valores compuestos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de enrofloxacin contra *Leptospira* spp; CMI₅₀ = 0.5 µg/mL and CMI₉₀ = 1.0 µg/mL.

Origen de CMI	Enrofloxacin (5 µg/mL)							
	0.031	0.625	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
Literatura†	0	0	1	4	5	6	1	2
Pruebas de microdilución y macrodilución	0	1	0	1	4	1	0	0
Total	0	1	1	5	9	7	1	2

†Kim *et al.*, 2006; Miraglia *et al.*, 2013; Carrascosa *et al.*, 2015; Liegeon *et al.*, 2018

Cuadro 3.3 Relación Farmacocinética/Farmacodinamia (PK/PD) de la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin de referencia (enro-R)

Relación PK/PD	enro-C ₁₀	enro-C ₁₅	enro-C ₂₀	enro-R ₁₀	enro-R ₁₅	enro-R ₂₀
C _{MAX} /CMI ₉₀	6.17	8.75	13.89	2.46	3.54	4.25
C _{MAX} /CMI ₅₀	12.34	17.5	27.78	4.92	7.08	8.5
AUC ₀₋₂₄ /CMI ₉₀	36.71	58.72	88.61	8.83	20.35	25.15
AUC ₀₋₂₄ /CMI ₅₀	73.42	117.44	177.22	17.66	40.70	50.30

†C_{MAX}/CMI₉₀ = Relación PK/PD para el fármaco antimicrobiano dependiente de la concentración; AUC₀₋₂₄/CMI₉₀ = relación PK/PD para una CMI₉₀.

‡Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ se originaron de las pruebas de sensibilidad realizadas en este estudio y los descritos en la literatura.

Las probabilidades de lograr el objetivo establecido para las simulaciones de Monte Carlo fueron C_{MAX}/CMI = 10 o AUC₀₋₂₄/CMI = 125 para todas las dosis de ambas formas químicas de enrofloxacin. Estos resultados de las simulaciones se muestran en las Figuras 3.2 y 3.3. De las predicciones obtenidas por estas simulaciones, es evidente que si la infección por *Leptospira* spp. tiene una sensibilidad in vitro menor o equivalente a 0.5, solo las dosis de 15 o 20 mg/kg de enro-C pueden cumplir con los objetivos establecidos.

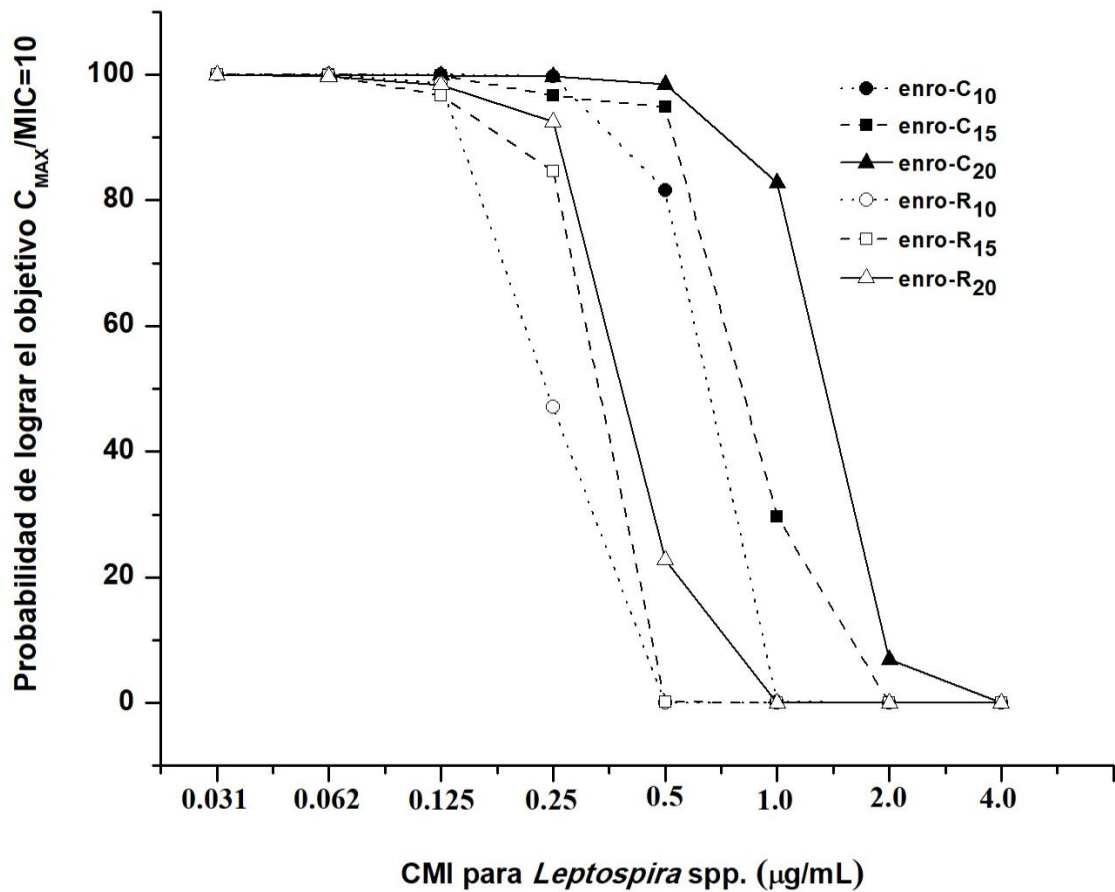


Figura 3.2 Probabilidad de lograr el objetivo $C_{MAX}/CMI=10$ después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacina clorhidrato-dihidrato (enro-C) y enrofloxacina de referencia (enro-R) vs valores de concentración mínima inhibitoria de *Leptospira* spp.

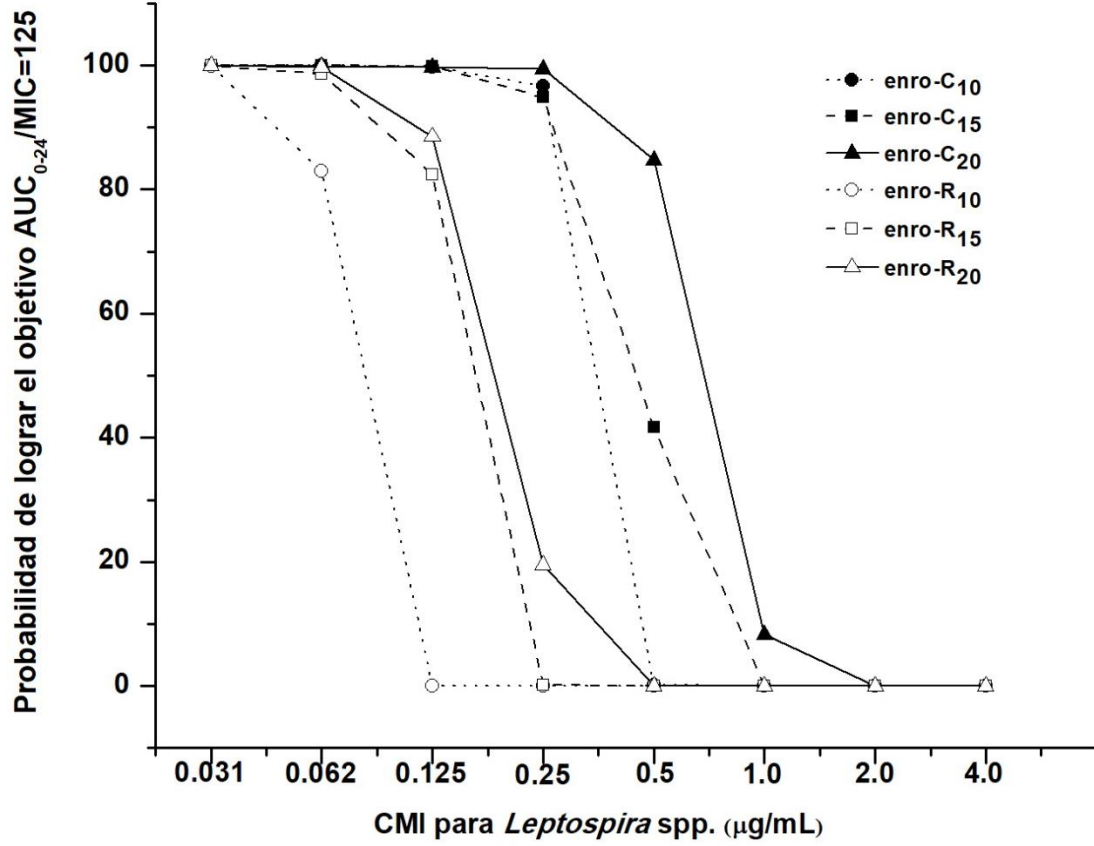


Figura 3.3 Probabilidad de lograr el objetivo $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$ después de inyecciones IM de 10, 15 y 20 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) y enrofloxacin de referencia (enro-R) vs valores de concentraciones mínimas inhibitorias de *Leptospira* spp.

Ciento cincuenta y cuatro casos fueron inicialmente considerados para recibir alguno de los dos tratamientos. Sin embargo, después de obtener los resultados de MAT, solo 143 fueron incluidos en el estudio. Por lo que se consideró un error de diagnóstico de 8.5%, que inicialmente fueron clasificados con riesgo medio.

El cuadro 3.4 muestra el promedio \pm E.E de títulos de anticuerpos contra *Leptospira* iniciales y promedios obtenidos 28 días después la aplicación de enro-C y estreptomocina. Se observó una reducción significativa de títulos de anticuerpos antileptospira en todos los

casos tratados con enro-C y estreptomicina/penicilina G procaínica (1 y 2) ($P < 0.05$). La comparación entre grupos de tratamiento dentro del mismo escenario, permite señalar que la disminución de títulos de anticuerpos iniciales y 28 días después del tratamiento, es significativamente mayor en el grupo enro-C₁ frente a estreptomicina/penicilina₁ (cuadro 3.4). En el caso de enro-C₂ y estreptomicina₂, no se obtuvo diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 3.4 Títulos de anticuerpos obtenidos mediante aglutinación microscópica (MAT) de muestras de vacas afectadas por *Leptospira* spp., y tratadas con enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o estreptomicina mas penicilina G procaínica IM (estreptomicina/penicilina) y 28 días después de finalizado el tratamiento en dos escenarios geográficos, en altiplano (1) y trópico (2).

Tratamiento	Promedio \pm E.E de títulos de anticuerpos	
	Antes del Tratamiento	28 días Después del Tratamiento
enro-C ₁	704 \pm 71.94 ^a	328 \pm 29.32 ^{b,A}
Estreptomicina/penicilina ₁	615 \pm 39.76 ^a	441 \pm 34.23 ^{b,B}
enro-C ₂	271.05 \pm 36.93 ^a	88.15 \pm 10.50 ^{b,A}
Estreptomicina/penicilina ₂	288.57 \pm 32.20 ^a	158.57 \pm 19.70 ^{b,A}

^{a,b} Diferente literal indica diferencia estadística significativa entre los valores de la fila ($P < 0.05$).

^{A,B} Diferente literal indica diferencia estadística significativa entre los valores de la columna ($P < 0.05$).

El seguimiento de casos hasta por 90 días después del tratamiento, permitió establecer una evolución satisfactoria de los signos reproductivos inicialmente observados. El cuadro 3.5 resume cada una de estas variables reproductivas y el tiempo hasta alcanzar una resolución satisfactoria, así también la proporción de vacas gestantes al final de este periodo. Por desición del propietario, dos vacas tratadas con enro-C₁ y cinco con estreptomicina₁ con historia previa de problemas reproductivos se eliminaron del establo. Por lo tanto, el seguimiento no se completó.

Cuadro 3.5 Valores medios ± 1 DE de parametros reproductivos observados hasta el día 90 despues de finalizar el tratamiento IM con 15 mg/kg de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C) o 25 mg/kg de estreptomycin/penicilina G procaínica en la resolución de signos clínicos atribuibles a leptospirosis en bovinos. Se presentan dos escenarios geográficos: altiplano con vacas Holstein Friesian y tropico con vacas F1 cruza de Cebú x Holstein Friesian y Cebú x Pardo Suizo.

Variable reproductiva	enro-C₁	estreptomycin₁	enro-C₂	estreptomycin₂
Resolución de metritis (días)	44.29 \pm 21.47	58.63 \pm 16.78	44 \pm 11.31	---
Retención placentaria (días)*	42.16 \pm 14.41	45.5 \pm 15.94	30.66 \pm 9.71	33.25 \pm 10.65
Primer estro (días) †	39 \pm 15.42	46.62 \pm 18.31	34.77 \pm 11.23	39.62 \pm 12.10
Primer inseminación artificial (días) ‡	47 \pm 20.76	53.53 \pm 16.97	---	---
Primer inseminación artificial a concepción (días)	22.5 \pm 34.48	26.33 \pm 28.32	---	---
Servicios por concepción	1.88 \pm 1.03	2.04 \pm 1.13	---	---
Gestación (%)§	86.53	79.06	88.88	87.5

* Tiempo desde la retención placentaria hasta el primer estro

† Intervalo desde el parto, el aborto o el tratamiento de la momificación hasta el primer estro detectado

‡ Intervalo desde el nacimiento, aborto o tratamiento de momificación hasta la primera inseminación artificial

§ Total de vacas gestantes después de un aborto, momificación fetal, retención placentaria o metritis

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las características fisicoquímicas distintivas de enro-C es su mayor solubilidad en agua, en comparación con la enrofloxacin estándar, es decir, es 20 veces más soluble en agua (Gutiérrez *et al.*, 2015). Esto explica en parte los valores de C_{MAX} estadísticamente significativos más altos obtenidos para enro-C, en comparación con enro-R. Se ha documentado un comportamiento similar de otros principios activos después de su recristalización (Hibbard *et al.*, 2002; Bubu & Nangia, 2011; Blandizzi *et al.*, 2014; Kalepu & Nekkanti, 2015). En este ensayo, enro-C a dosis de 10 mg/kg IM alcanza concentraciones séricas de enrofloxacin 2.5 veces más altas en comparación con los valores correspondientes de enro-R. Por lo tanto, enro-C merece ser considerado como una nueva entidad farmacológica/farmacéutica ($C_{MAX} = 6.17 \mu\text{g/mL}$ para enro-C₁₀ y una $C_{MAX} = 2.46 \mu\text{g/mL}$ para enro-R₁₀). A pesar de los aumentos estadísticamente significativos dependientes de la dosis en la mayoría de los parámetros PK encontrados en este estudio, la C_{MAX} para enro-C₁₅ mostró un incremento de solo $2.58 \mu\text{g/mL}$, en comparación con la C_{MAX} de enro-C₁₀; mientras que la diferencia entre enro-C₁₅ y enro-C₂₀ fue de $5.14 \mu\text{g/mL}$. Las mismas comparaciones para enro-R muestran valores incrementales de solo 1.08 y $0.71 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a una disolución más completa de enro-C en fluidos corporales y una menor irritación de los tejidos, cuando se inyectan altas dosis del fármaco antibacteriano. Además, el pH de la suspensión de enro-C al 10% es aproximadamente 6.5 y Enro-R de 10.4.

El valor de C_{MAX} de enro-C₁₀ fue estadísticamente superior a enro-R₁₀ ($P < 0.01$), por el contrario, fue estadísticamente indistinguible de los valores de C_{MAX} de enro-R₁₅ y enro-R₂₀. Se observa un patrón similar con AUC_{0-24} , cuyos aumentos casi lineales se obtienen con dosis crecientes de 10 mg/kg a 15 mg/kg y de esta dosis a 20 mg/kg ($P < 0.05$ en ambos casos). Otros valores de PK no fueron diferentes al comparar enro-C₁₀ frente a enro-R₁₀, es decir, $T_{1/2\beta}$ y MRT. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios de biodisponibilidad de enro-C en comparación con enro-R en pollos de engorde después de la administración oral (Gutiérrez *et al.*, 2015); en hámsters después de la inyección

intramuscular (Carrascosa *et al.*, 2015); y en perros después de la inyección oral e intramuscular de ambos fármacos antimicrobianos (Sumano *et al.*, 2018).

Los valores de volumen de distribución aparente/área bajo la curva (Vd_{AUC}) no se pudieron calcular, porque no fue posible la disolución completa de enro-C 10% para inyección intravenosa. En consecuencia, las mejoras en diseño farmacéutico de enro-C siguen siendo necesarias, así como la investigación adicional para determinar si la distribución tisular de enro-C es comparable o no a la encontrada para enro-R. Sin embargo, si se suponen valores similares de Vd_{AUC} para ambas formas químicas de enrofloxacin. Por ejemplo, 4.09 L/kg (Varma *et al.*, 2003), es posible predecir concentraciones tisulares más altas para enro-C, como lo reportaron Carrascosa *et al.* (2015) en un estudio en hámsters. Si esta suposición es correcta, las concentraciones de enrofloxacin en los tejidos serían mayores y, a su vez, esto podría explicar en parte su utilidad teórica para tratar la leptospirosis después de la fase septicémica (aguda).

A la fecha, no existe un método estándar aceptado para evaluar la actividad de antibacterianos contra *Leptospira* spp. a nivel laboratorio y la mayoría de estos no cultivan leptospiras debido a su tasa de crecimiento elusiva y lenta (Murray & Hospenthal, 2004; Musso & La Scola, 2013). Al respecto, es necesario resaltar que los valores de sensibilidad de *Leptospira* spp. a enrofloxacin encontrado en la literatura fluctúa entre 0.1 y 4.0 (Kim *et al.*, 2006; Liegeon *et al.*, 2018; Miraglia *et al.*, 2013). Estos datos se consideraron insuficientes para realizar un metaanálisis de patrones de susceptibilidad de *Leptospira* spp. En consecuencia, no se puede determinar un punto de corte para enrofloxacin contra este patógeno. Por consiguiente, para realizar las simulaciones de Monte Carlo con enro-R y enro-C, se usaron valores compuestos CMI_{50} y CMI_{90} derivados de un estudio a pequeña escala (7 aislamientos) en combinación con los reportados en la literatura.

El cumplimiento de las relaciones PK/PD y las simulaciones son un recurso eficiente para evaluar el uso adecuado de medicamentos antibacterianos, permite una certeza razonable al recomendar un medicamento antibacteriano para tratar una infección bacteriana específica por primera vez, minimizando así los riesgos relacionados con la falta de eficacia. Se ha aceptado que las relaciones PK/PD permiten distinguir dos grupos de fármacos antibacterianos de acuerdo a su actividad, es decir, tiempo dependientes y concentración

dependientes. Para el primero, la eficacia clínica se logra cuando las concentraciones de fármaco en plasma están por encima de los valores de CMI durante el mayor tiempo posible entre los intervalos de dosificación ($T > CMI$). Para el último, la eficacia clínica se logra al alcanzar valores altos de C_{MAX} y/o AUC_{0-24} (relaciones para enrofloxacin: $C_{MAX}/CMI \geq 10-12$ y $AUC_{0-24}/CMI \geq 125$) (Sidhu *et al.*, 2010; Velkov *et al.*, 2013; Canut *et al.*, 2015; Onufrak *et al.*, 2016). En este estudio, las relaciones C_{MAX}/CMI_{90} fueron 6.17, 8.75 y 13.89 para enro-C₁₀, enro-C₁₅ y enro-C₂₀, y 2.46, 3.54 y 4.25 para enro-R₁₀, enro-R₁₅ y enro-R₂₀, respectivamente; mientras que las relaciones AUC_{0-24}/CMI_{90} fueron 36.71, 58.72 y 88.61 para los grupos enro-C, y 8.83, 20.35 y 25.15 para los grupos enro-R. Esto indica que si *Leptospira* spp. tiene una CMI de 0.5 µg/mL o menos, es factible esperar eficacia clínica solo administrando enro-C. Sin embargo, una predicción más aceptada para la eficacia clínica puede derivarse de las simulaciones de Monte Carlo. Las probabilidades de alcanzar el objetivo de $C_{MAX}/CMI = 10$ o $AUC_{0-24}/CMI = 125$, probando las tres dosis estudiadas para enro-C y enro-R, predicen que la eficacia clínica para enro-R mediante la administración de cualquiera de las tres dosis probadas, sería pobre cuando se considera CMI_{50} o CMI_{90} establecido en este estudio (0.5 o 1.0 µg/mL). Por el contrario, se predice alrededor del 90% de la eficacia clínica al inyectar 15 o 20 mg/kg de enro-C contra infecciones causadas por *Leptospira* spp. con una $CMI_{90} \leq 1.0$ µg/mL y cercana al 100% con una $CMI_{50} \leq 0.5$ µg/mL.

Aunque la enrofloxacin no se recomienda en el tratamiento de la leptospirosis en el ganado bovino, debido a las concentraciones subterapéuticas que se logran después de la administración de dosis usuales (5 a 10 mg/kg), este estudio muestra cómo su solvato enro-C, se comporta como otra entidad farmacológica y exhibe mejores relaciones PK/PD que enro-R para tratar esta enfermedad. De acuerdo con lo anterior, se han encontrado resultados alentadores para tratar infecciones experimentales en hámsters inoculados con *Leptospira interrogans* (Carrascosa *et al.*, 2017).

El análisis PK/PD, las simulaciones Monte Carlo (Sumano *et al.*, 2018) y los estudios de eficacia de la enro-C en perros, la postulan para el tratamiento de leptospirosis. Con base en los resultados PK/PD y de simulaciones Monte Carlo aquí mostrados, se propone la inyección IM diarias de enro-C (15 mg/kg) durante al menos 5 días. Sin embargo, las

simulaciones de Monte Carlo indican que si una infección por *Leptospira* spp. tiene un valor de CMI ≥ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aun las inyecciones diarias de $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de enro-C solo alcanzarían una tasa de éxito aproximada del 7%, en cuyo caso enro-C no debe considerarse como una opción para tratar estos casos. La elección de la dosis relativamente alta de enro-C es en concordancia con la mayoría de los autores que sugieren una dosis alta de una fluoroquinolona para obtener una concentración optima terapéutica y preventiva de mutantes, lo que reduciría la generación de cepas resistentes.

Los pocos estudios de CMI de *Leptospira* contra enrofloxacin disponibles en la literatura mundial, son importantes en el contexto local considerando las variaciones en la sensibilidad bacteriana a lo largo de diferentes ambientes y regiones geográficas. Por tanto pueden no ser representativos en ambientes tropicales y subtropicales, lo que es una limitante en establecimiento de la dosis terapéutica. Sin embargo, estos valores al ser integrados a las simulaciones Monte Carlo permiten considerar todas estas variaciones y así predecir con mayor certeza una probabilidad de eficacia.

En una segunda fase de estudio, se seleccionaron casos basados en la combinación de signos clínicos reproductivos títulos MAT. Pa minimizar la interferencia de otros factores, se excluyeron algunos casos de estudio, como las vacas que requirieron líquidos y electrolitos, antiinflamatorios o tratamiento hormonal o cuando se consideraron necesarios otros tratamientos locales del aparato reproductor. Con base en el historial de vacunación y características clínicas seleccionadas, se excluyeron otras enfermedades reproductivas con signos similares a leptospirosis, como brucelosis, neosporosis, diarreal viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina y campilobacteriosis.

Debido a las condiciones de manejo en unidades de producción en el escenario 1, no fue posible el aislamiento de las vacas durante el estudio. Por consiguiente, fueron separados del resto de los animales y se implementaron acciones de limpieza e higiene en el área de alimentación y sala de ordeño, y se restringió el contacto con fauna nociva (roedores) para disminuir los riesgos de reinfección y diseminación de la enfermedad (Fávero *et al.*, 2017; Martins y Lilenbaum, 2017). De forma similar, en el escenario 2 solo se pudieron separar de los animales no tratados, debido a las condiciones de producción en sistema extensivo que imposibilitaron el aislamiento de animales durante el tratamiento.

Del total de vacas incluidas en el ensayo, solo el 12.3% de las vacas en altiplano (escenario 1) y el 100% en el trópico (escenario 2) habían sido previamente inmunizadas contra leptospirosis. Por lo tanto, según las recomendaciones de OIE (2018), los valores ≥ 200 se tomaron como indicadores en vacas sin vacunación previa, y valores ≥ 400 con más de 90 días después de la vacunación para ser considerados seropositivos. Según Martins *et al.*, (2018), la respuesta humoral se produce rápidamente después de la vacunación alcanzando los títulos máximos alrededor del día 60, y a partir de este punto disminuyen los títulos de anticuerpos. Sin embargo, el nivel de titulación de anticuerpos puede variar dependiendo del número de serovares incluidas en la bacterina (Sanhueza *et al.*, 2018), incluso puede no inducir una respuesta humoral después de la vacunación (Fávero *et al.*, 2018), particularmente las bacterinas fabricadas con cepas de referencia internacional pueden no generar una protección adecuada contra cepas nativas (Martins & Lilembaun, 2017). Además, es importante señalar que la respuesta a la vacunación es específica de los serovares incluidas en la bacterina utilizada (Fernandes *et al.*, 2016). Por lo tanto, los títulos de anticuerpos > 200 de serovares no contenidas en la bacterina, se consideraron positivos. La prueba de MAT estuvo disponible 7-15 días después del examen clínico inicial. Por esta razón, todas las vacas diagnosticadas inicialmente con leptospirosis recibieron cualquiera de los dos tratamientos. Sin embargo, solo aquellas con valores de MAT arriba descritos fueron incluidas en este ensayo.

La dosis de enro-C fijada en 15 mg/kg se estableció con base en la alta probabilidad de lograr el objetivo $C_{MAX}/CMI = 10$ (Simulaciones Monte Carlo) obtenidas en la fase 1, que es esencial para optimizar la eficacia de enrofloxacin para tratar leptospirosis bovina. La elección de estreptomycin mas penicilina G procaínica, como tratamiento de referencia, se basó en las recomendaciones de la literatura (Ellis 2015; Alt *et al.*, 2001). Se ha aceptado una alta eficacia con estreptomycin a pesar de su eliminación renal a corto plazo y su bajo volumen de distribución (< 0.2 L/kg) (Riviere & Papich, 2018). Parecería que la estreptomycin puede ser útil en casos de leptospiremia o cuando se produce una acumulación de *Leptospira* spp. en el túbulo renal proximal, pero es poco probable que la estreptomycin alcance concentraciones terapéuticas en el tracto reproductivo (Cabral *et al.*, 2018; Di Azevedo *et al.*, 2020), que es una presentación crónica muy común de esta enfermedad en bvinos (Loureiro & Lilembaun, 2020). Se ha demostrado que otros

fármacos antibacterianos poseen cierto grado de eficacia, por ejemplo, amoxicilina (Smith *et al.*, 1997), oxitetraciclina, tilmicosina y ceftofur (Alt *et al.*, 2001). Por el contrario, las fluoroquinolonas no son particularmente efectivas en el tratamiento de la leptospirosis en medicina veterinaria (Griffith *et al.*, 2007; Mauro & Harkin, 2019; Wu *et al.*, 2017). En contraste, enro-C es altamente eficaz contra *Leptospira* spp. en el modelo haster (Carrascosa *et al.*, 2017) y casos clínicos en perros (Gutierrez *et al.*, 2019), pero no se han probado ni enro-C ni otras fluoroquinolonas en el ganado. En este ensayo, la motivación para desafiar a enro-C en casos de leptospirosis en vacas se basó en su relación farmacocinética/farmacodinámica mejorada ya mencionada, y dado el volumen de distribución de enrofloxacin en vacas (2.5-4 L / kg) (Varma *et al.*, 2003; Riviere y Papich, 2018). Ciertamente, el logro de concentraciones terapéuticas de enrofloxacin en el tracto renal y reproductivo cuando se usa enro-C requiere confirmación, pero las tasas de curación observadas en este ensayo así lo sugieren. La disminución en los títulos de anticuerpos observada tras el tratamiento con 15 mg/kg de enro-C, sigue los patrones reportados por Gerritsen *et al.*, (1993) luego de administrar una dosis de 25 mg/ kg/día de estreptomina y cumplen bien con la eficacia previamente reportada de enro-C para tratar perros (Gutiérrez *et al.*, 2019). Por lo tanto, se asume que esta tendencia a la reducción de los títulos de anticuerpos se asocia con una disminución o ausencia de bacterias, como lo demostraron Carrascosa *et al.*, (2017) en el modelo de hámster de leptospirosis. Además, el seguimiento hasta por 90 días después del tratamiento demostraron una resolución satisfactoria de signos reproductivos en todas las vacas tratadas con enro-C, lo que mejoró la eficiencia reproductiva alcanzando 86.53% y 88.88% (en altiplano y trópico respectivamente), valores aceptables según Galina & Valencia (2008). Se deben realizar pruebas de PCR que confirmen la ausencia de *Leptospira* a nivel renal mediante análisis de orina (fang *et al.*, 2014) y de aparato reproductor (Loureiro & Lilenbaum, 2020), y que en asociación con MAT permita determinar la eficacia del tratamiento.

Desde un punto de vista ético, es cuestionable y muy costoso inducir leptospirosis en vacas sanas (Sykes *et al.*, 2011). Por lo tanto, los ensayos clínicos de brotes de campo se vuelven esenciales. En particular, los estudios multicéntricos en diferentes entornos y condiciones de manejo pueden fortalecer o debilitar la evidencia de la eficacia de un fármaco

antibacteriano en una prueba. Esto se intentó para enro-C en este ensayo y los resultados sugieren una alta eficacia clínica para enro-C en el tratamiento de la leptospirosis en vacas. Además, no se observaron efectos adversos, incluso en los lugares de inyección, ya que la suspensión al 10% de enro-C tiene un pH de 6,5 y no fue irritante ni doloroso cuando se inyectó. Adicionalmente, es importante señalar que si bien la terapia antibiótica es una parte muy importante de la estrategia para el control de brotes de leptospirosis bovina, la vacunación y la implementación de medidas sanitarias son elementos que se deben evaluar cuidadosamente para controlar esta enfermedad. Es necesario mencionar que en México no existe un producto a base de estreptomina diseñado para el tratamiento de la leptospirosis bovina. A pesar de la evidencia farmacológica en contra del uso de combinaciones de penicilina G estreptomina disponibles en el mundo (NRA, 1999; Riviere & Papich, 2018), todas las preparaciones de estreptomina contienen penicilina G en México y la mayoría de los países latinoamericanos. Por tanto, los tratamientos de referencia se basaron necesariamente en esta combinación.

Es necesario el establecimiento de pruebas PCR para la determinación de cura bacteriológica de muestras de orina. En este ensayo no fue posible establecer dicha prueba debido a la situación sanitaria durante el último año. Por lo que, imposibilita informar de una cura bacteriológica lograda con enro-C. A pesar de lo anterior, los allazgos aquí presentados alientan a probar enro-C en casos clínicos y brotes de leptospirosis en otros escenarios a fin de confirmar su eficacia y potencial uso para esta enfermedad.

Finalmente, los valores farmacocinéticos de la enro-C en comparación a la enrofloxacin de referencia son superiores en todas las dosis probadas, y que mediante su integración PK/PD y simulaciones Monte Carlo, indican que su administración a dosis de 15 mg/kg/IM durante 5 días para el tratamiento de leptospirosis bovina es eficaz para la corrección de signos clínicos reproductivos y puede ser una opción a considerar en brotes de leptospirosis. Futuros ensayos con enro-C ratificarían la eficacia clínica y bacteriológica para su uso contra *Leptospira* spp en bovinos.

V. REFERENCIAS

Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 27;140(3-4):287-96. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219(5):636-9. doi: 10.2460/javma.2001.219.636.

Ambrose PG, Bhavnani SM, Owens RC Jr. Clinical pharmacodynamics of quinolones. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17(3):529-43. doi: 10.1016/s0891-5520(03)00061-8.

Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol.* 2015;71(1):136-42. doi: 10.1007/s00284-015-0836-4.

Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother.* 2015;21(5):319-29. doi: 10.1016/j.jiac.2015.02.001.

Bhavnani SM, Hammel JP. Clinical pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses: a critical element for developing antibacterial agents. *Curr Opin Pharmacol.* 2017;36:124-129. doi: 10.1016/j.coph.2017.09.010.

Blandizzi C, Viscomi GC, Scarpignato C. Impact of crystal polymorphism on the systemic bioavailability of rifaximin, an antibiotic acting locally in the gastrointestinal tract, in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther.* 2014;16;9:1-11. doi: 10.2147/DDDT.S72572.

Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res.* 2001;62(7):995-1000. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.995.

Bonate PL. Clinical trial simulation in drug development. *Pharm Res.* 2000;17(3):252-6. doi: 10.1023/a:1007548719885.

Brown RA, Blumerman S, Gay C, Bolin C, Duby R, Baldwin CL. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine*. 2003;21(27-30):4448-58. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00439-0.

Bubu JN, Nangia A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Crystal Growth & Desing*. 2011; (11); 2662– 2679. doi.org/10.1021/cg200492w

Cabral Pires B, Berzin Grapiglia J, Moreira L, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA, Lilenbaum W. Occurrence of uterine carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. *Microb Pathog*. 2018;114:163-165. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.056.

Canut BA, Aguilar AL, Cobo RJ, Giménez MMJ, Rodríguez-Gascón A. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33, 48–57. doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.023

Carrascosa A, De la Peña A, Gutiérrez L, Sumano H. Serum pharmacokinetics and tissue concentrations of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride-dihydrate in hamsters. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2015; 39, 661–667. doi.org/10.3906/vet-1504-104

Carrascosa A, Gutierrez L, De la Peña A, Candanosa IE, Tapia G, Sumano H. Efficacy of a New Recrystallized Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate against Leptospirosis in a Hamster Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;24;61(11):e01285-17. doi: 10.1128/AAC.01285-17.

Chin VK, Basir R, Nordin SA, Abdullah M, Sekawi Z. Pathology and Host Immune Evasion During Human Leptospirosis: a Review. *Int Microbiol*. 2020;23(2):127-136. doi: 10.1007/s10123-019-00067-3.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007;75(5):2441-50. doi: 10.1128/IAI.01635-06.

Coetzee JF, Apley MD. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. *Vet Ther.* 2006;7(3):319-28. PMID: 17039454.

Cortese VS, Gallo GF, Cleary DL, Galvin JE, Leyh RD. Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves. *Am J Vet Res.* 2014;75(5):507-12. doi: 10.2460/ajvr.75.5.507.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(9): e0003898. doi:10.1371/journal.pntd.0003898

Craig WA. Does the dose matter? *Clin Infect Dis.* 2001;15;33 Suppl 3:S233-7. doi: 10.1086/321854.

de Lucas JJ, San Andrés MI, González F, Froyman R, Rodríguez C. Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Vet Res Commun.* 2008;32(4):275-9. doi: 10.1007/s11259-008-9037-y.

Delooz L, Czaplicki G, Gregoire F, Dal Pozzo F, Pez F, Kodjo A, Saegerman C. Serogroups and genotypes of *Leptospira* spp. strains from bovine aborted fetuses. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(1):158-165. doi: 10.1111/tbed.12643.

Di Azevedo MIN, Pires BC, Libonati H, Pinto PS, Cardoso Barbosa LF, Carvalho-Costa FA, et al. Extra-renal bovine leptospirosis: Molecular characterization of the *Leptospira interrogans* Sejroe serogroup on the uterus of non-pregnant cows. *Vet Microbiol.* 2020;250:108869. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108869.

Dib CC, Gonçalves AP, de Moraes ZM, de Souza GO, Miraglia F, Abreu PA, et al. Cross-protection between experimental anti-leptospirosis bacterins. *Braz J Microbiol.* 2014;45(3):1083-8. doi: 10.1590/s1517-83822014000300042.

Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: Adler B. (eds) *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol 387. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_6.

Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010;5(9):1413-25. doi: 10.2217/fmb.10.102.

Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009;2(1):40-61. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd ed. Medisci press. Melbourne, Australia. 2000.

Fang F, Collins-Emerson JM, Cullum A, Heuer C, Wilson PR, Benschop J. Shedding and seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep and cattle at a New Zealand Abattoir. *Zoonoses Public Health.* 2015;62(4):258-68. doi: 10.1111/zph.12146.

Fang F, Collins-Emerson JM, Heuer C, Hill FI, Tisdall DJ, Wilson PR, et al. Interlaboratory and between-specimen comparisons of diagnostic tests for leptospirosis in sheep and cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2014;26(6):734-47. doi: 10.1177/1040638714548476.

Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb Pathog.* 2017;107:149-154. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.032.

Fávero JF, Fritzen A, Lovato LT, Martins P, Baldissera MD, Stefani LM, Da Silva AS. Immune response of a commercial vaccine against *Leptospira interrogans*: Antibodies and cytokine levels. *Microb Pathog.* 2018;114:46-49. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.042.

Fernandes LG, Siqueira GH, Teixeira AR, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;176:50-7. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.12.004.

Galina C, Valencia J. *Reproducción de animales domésticos.* 3^a Ed. Limusa. México. 2008

Goris MG, Hartskeerl RA. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr Protoc Microbiol.* 2014; 6;32:Unit 12E.5.. doi: 10.1002/9780471729259.mc12e05s32.

Guernier V, Allan KJ, Goarant C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology*. 2018;145(5):595-607. doi:10.1017/S0031182017001147

Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Dekker TC, De Jong MC, Moerman A, Olyhoek T. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. *Am J Vet Res*. 1994;55(3):339-43.

Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Olyhoek T. Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in experimentally infected cows. *Vet Microbiol*. 1993;38(1-2):129-35. doi: 10.1016/0378-1135(93)90080-q.

Griffith ME, Moon JE, Johnson EN, Clark KP, Hawley JS, Hospenthal DR, Murray CK. Efficacy of fluoroquinolones against *Leptospira interrogans* in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(7):2615-7. doi: 10.1128/AAC.00240-07.

Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019; 13(4), e0007374. doi: 10.1371/journal.pntd.0007374

Gutierrez L, Mendoza J, Rangel AB, Tapia G, Bernad MJ, Sumano H. Outpatient Clinical Trial in Dogs With Leptospirosis Treated With Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate (ENRO-C). *Front Vet Sci*. 2019;15;6:360. doi: 10.3389/fvets.2019.00360.

Gutierrez L, Miranda-Calderon JE, Garcia-Gutierrez P, Sumano H. Physicochemical characterization and pharmacokinetics in broiler chickens of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride dihydrate. *J Vet Pharmacol Ther*. 2015;38(2):183-9. doi: 10.1111/jvp.12153.

Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Pestana C, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, et al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet Res Commun*. 2014;38(1):81-5. doi: 10.1007/s11259-013-9582-x.

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

Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51 Suppl 1:29-35. doi: 10.1093/jac/dkg207

Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2017;1546:125-133. doi: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8.

Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods*. 2011;84(1):1-7. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.021.

Hibbard B, Robb EJ, Chester ST Jr, Dame KJ, Boucher JF, Alaniz GR. Dose determination and confirmation of a long-acting formulation of ceftiofur (ceftiofur crystalline free acid) administered subcutaneously for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther*. 2002;25(3):175-80. doi: 10.1046/j.1365-2885.2002.00403.x.

Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*. 2008;76(5):2063-9. doi: 10.1128/IAI.01643-07.

Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001;15;32 Suppl 1:S9-S15. doi: 10.1086/319370.

Idowu OR, Peggins JO. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;35(1):143-53. doi: 10.1016/j.jpba.2004.01.006.

Idowu OR, Peggins JO, Cullison R, Bredow JV. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res Vet Sci*. 2010;89(2):230-5. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.12.019.

Kaartinen L, Salonen M, Alli L, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995;18(5):357-62. doi: 10.1111/j.1365-2885.1995.tb00604.x.

Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2015; 5, 442–453. doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003

Kim D, Kordick D, Divers T, Chang YF. In vitro susceptibilities of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* isolates to amoxicillin, tilmicosin, and enrofloxacin. *J Vet Sci.* 2006;7(4):355-9. doi: 10.4142/jvs.2006.7.4.355.

Kitamura Y, Yoshida K, Kusama M, Sugiyama Y. A proposal of a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index map for selecting an optimal PK/PD index from conventional indices (AUC/MIC, C_{max}/MIC, and TAM) for antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(6):455-62. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-14-RG-013.

Kroese DP, Brereton T, Taimre T, Botev ZI. Why the Monte Carlo method is so important today. *WIREs Comput Stat.* 2014;6: 386-392. doi.org/10.1002/wics.1314

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326.

Li C, Motaleb A, Sal M, Goldstein SF, Charon NW. Spirochete periplasmic flagella and motility. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000;2(4):345-54.

Liegeon G, Delory T, Picardeau M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of leptospira. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(5):693-699. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.024.

Lilenbaum W, Souza GN. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science.* 2003; 75(3):249-251 doi.10.1016/S0034-5288(03)00114-0.

López-Cadenas C, Sierra-Vega M, García-Vieitez JJ, Díez-Liébana MJ, Sahagún-Prieto A, Fernández-Martínez N. Enrofloxacin: pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. *Curr Drug Metab.* 2013 ;14(10):1042-58. doi: 10.2174/1389200214666131118234935.

- Loureiro AP, Lilenbaum W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*. 2020;141:41-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011.
- Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. *Int Microbiol*. 2017;20(4):184-193. doi: 10.2436/20.1501.01.302.
- Martínez-Cortés I, Gutierrez L, Tapia G, Sumano H. Plasma and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph. *Medycyna Weterynaryjna*. 2016;72, 686–692. doi.org/10.21521/mw.5587
- Martinez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J*. 2006;172(1):10-28. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.07.010.
- Martins G, Lilenbaum W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res Vet Sci*. 2017;112:156-160. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.021.
- Martins G, Oliveira CS, Lilenbaum W. Dynamics of humoral response in naturally-infected cattle after vaccination against leptospirosis. *Acta Trop*. 2018;187:87-91. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.07.014.
- Martins G, Penna B, Lilenbaum W. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. *Vet Rec*. 2010;167(16):629-30. doi: 10.1136/vr.c5695. PMID: 21257450.
- Mauro T, Harkin K. Persistent Leptospirosis in Five Dogs Despite Antimicrobial Treatment (2000-2017). *J Am Anim Hosp Assoc*. 2019;55(1):42-47. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6882.
- McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004;27(6):503-14. doi: 10.1111/j.1365-2885.2004.00603.x.
- Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(3):195-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003.

Miranda-Calderón JE, Gutiérrez L, Flores-Alamo MP, García- Gutierrez P, Sumano H. Enrofloxacin hydrochloride dihydrate. *Acta Crystallographica Section E*. 2014; 70, 0468–0469. doi. org/10.1107/S1600536814006059

Monte LG, Ridieri KF, Jorge S, Oliveira NR, Hartwig DD, Amaral MG, et al. Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015;40:41-5. doi: 10.1016/j.cimid.2015.04.001.

Mori M, Bakinahe R, Vannoorenberghe P, Maris J, de Jong E, Tignon M, Marin M, et al. Reproductive Disorders and Leptospirosis: A Case Study in a Mixed-Species Farm (Cattle and Swine). *Vet Sci*. 2017;4(4):64. doi: 10.3390/vetsci4040064.

Mughini-Gras L, Bonfanti L, Natale A, Comin A, Ferronato A, La Greca E, et al. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiol Infect*. 2014;142(6):1172-81. doi: 10.1017/S0950268813001817.

Murphy K. Leptospirosis: a review to aid diagnosis and treatment. *Companion Animal*. 2015; 20:9:510-516. doi.10.12968/coan.2015.20.9.510

Murray GL. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:139-85. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_7.

Murray CK, Hospenthal DR. Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1548-52. doi: 10.1128/aac.48.5.1548-1552.2004.

Murray GL, Srikram A, Hoke DE, Wunder EA Jr, Henry R, Lo M, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2009;77(3):952-8. doi: 10.1128/IAI.01370-08.

Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):245-52. doi: 10.1016/j.jmii.2013.03.001.

Narayanavari SA, Lourdault K, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003952. doi: 10.1371/journal.pntd.0003952.

Narayanavari SA, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). *Microbiology (Reading)*. 2012;158(Pt 5):1137-1146. doi: 10.1099/mic.0.057737-0.

NRA: National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals (1999). Special Review of (Dihydro) streptomycin/penicillin Combination Products and (Dihydro) streptomycin Products. National Registration Authority, Canberra.

Onufrak NJ, Forrest A, Gonzalez D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Anti-infective Dosing. *Clin Ther*. 2016;38(9):1930-47. doi: 10.1016/j.clinthera.2016.06.015.

Organizacion Mundial de Sanidad Animal (OIE). *Leptospirosis en Manual Terrestre de la OIE*. 2018.

Papich MG. *Saunders handbook of veterinary drugs*. 2nd ed. Saunders Elsevier. Saint Louis, MO. 2007.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1-9. doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.

Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(5):297-307. doi: 10.1038/nrmicro.2017.5.

Pimenta CLRM, da Costa DF, Silva MLCR, Pereira HD, Júnior JPA, Malossi CD, et al. Strategies of the control of an outbreak of leptospiral infection in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2019;51(1):237-241. doi: 10.1007/s11250-018-1635-2.

Pinto Pda S, Libonati H, Penna B, Lilenbaum W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. *Trop Anim Health Prod*. 2016;48(2):239-48. doi: 10.1007/s11250-015-0954-9.

Pinto PS, Pestana C, Medeiros MA, Lilenbaum W. Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospire to cattle. *Acta Trop.* 2017;172:156-159. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.032.

Plumb C. *Plumb's veterinary drug handbook*. 6th ed. PharmaVet Inc. Stockholm, WI. 2008.

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014;22(8):438-45. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007.

Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(10):e1853. doi: 10.1371/journal.pntd.0001853.

Riviere JE, Papich MG. *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. Tenth ed. Wiley Blackwell. NJ, USA. 2018

Rocha BR, Balara M, Pereira PV, Martins G, Lilenbaum W. Chronic experimental genital leptospirosis with autochthonous *Leptospira santarosai* strains of serogroup Sejroe. *Small Ruminant Research.* 2018; 164:28-31. doi:10.1016/j.smallrumres.2018.04.015.a

Sanhueza JM, Wilson PR, Benschop J, Collins-Emerson JM, Heuer C. Meta-analysis of the efficacy of *Leptospira* serovar Hardjo vaccines to prevent urinary shedding in cattle. *Prev Vet Med.* 2018;153:71-76. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.015.

Sidhu PK, Landoni MF, Aliabadi FS, Lees P. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res Vet Sci.* 2010;88(1):134-41. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.013.

Smith BP. *Medicina interna de grandes animales*. 4th ed. Elsevier. España. 2010.

Smith CR, Corney BG, McGowan MR, McClintock CS, Ward W, Ketterer PJ. Amoxicillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Aust Vet J.* 1997;75(11):818-21. doi: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15661.x.

Sritharan M, Ramadevi S, Pasupala N, Tajne S, Asuthkar S. In silico identification and modelling of a putative iron-regulated TonB dependent outer membrane receptor protein

from the genome of *Leptospira interrogans* serovar Lai. Online Journal of Bioinformatics. 2005; 6, 74–90.

Sumano H, Ocampo L, Gutiérrez L. Non-bioequivalence of various trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows. Deutsche tier- arztliche Wochenschrift. 2001;108, 311–314.

Sumano H, Ocampo L, Gutiérrez L. Farmacología Veterinaria. Edición 4th ed. Ciudad de México, México. 2015.

Sumano H, Ocampo L, Tapia G, Mendoza CJ, Gutierrez L. Pharmacokinetics of enrofloxacin HCl-2H₂O (Enro-C) in dogs and pharmacokinetic/pharmacodynamic Monte Carlo simulations against *Leptospira* spp. J Vet Sci. 2018;30;19(5):600-607. doi: 10.4142/jvs.2018.19.5.600

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. J Vet Intern Med. 2011;25(1):1-13. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x.

Tennant SJ, Burgess D, Rybak JM, Martin C. Utilizing Monte Carlo Simulations to Optimize Institutional Empiric Antipseudomonal Therapy. Antibiotics; 2015;4, 643 - 652. doi.10.3390/antibiotics4040643

Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. Microb Genom. 2018;4(1):e000144. doi: 10.1099/mgen.0.000144.

Trang M, Dudley MN, Bhavnani SM. Use of Monte Carlo simulation and considerations for PK-PD targets to support antibacterial dose selection. Curr Opin Pharmacol. 2017;36:107-113. doi: 10.1016/j.coph.2017.09.009.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ. 2005;29(3):151-9. doi: 10.1152/advan.00019.2005.

Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. Cornell Vet. 1990;80(2):173-86.

Varma R, Ahmad AH, Sharma LD, Aggarwal P, Ahuja V. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26(4):303-5. doi: 10.1046/j.1365-2885.2003.00480.x.

Velkov T, Bergen PJ, Lora-Tamayo J, Landersdorfer CB, Li J. PK/PD models in antibacterial development. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(5):573-9. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.010.

Vieira ML, Vasconcellos SA, Gonçalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun.* 2009;77(9):4092-101. doi: 10.1128/IAI.00353-09.

Viveros M, Lopez-Ordaz R, Gutiérrez L, Miranda-Calderón JE, Sumano H. Efficacy assessment of an intramammary treatment with a new recrystallized enrofloxacin vs ceftiofur and parenteral enrofloxacin in dairy cows with nonsevere clinical mastitis. *J Vet Pharmacol Ther.* 2018;41(1):e1-e9. doi: 10.1111/jvp.12441.

Wagenaar JF, Goris MG, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu AT, de Kruif MD, et al. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Trop Med Int Health.* 2007;12(1):111-22. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01792.x.

World Health Organization (WHO). Human leptospirosis. Guidance for diagnosis, surveillance and control. International Leptospirosis Society. 2003.

Wu D, Zhang W, Wang T, Lin T, Jin X, Xie X, et al. Low-dose norfloxacin and ciprofloxacin therapy worsen leptospirosis in hamster. *Microb Pathog.* 2017; 102:36-41. doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.018.

Yamaguchi T, Higa N, Okura N, Matsumoto A, Hermawan I, Yamashiro T. Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2018; 4;18(1):64. doi: 10.1186/s12866-018-1206-8.

Yuan LG, Tang YZ, Zhang YX, Sun J, Luo XY, Zhu LX, et al. Dosage assessment of valnemulin in pigs based on population pharmacokinetic and Monte Carlo simulation. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38(4):400-9. doi: 10.1111/jvp.12199.

Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(4):684-91. doi: 10.1128/CVI.00288-10.