

Leptospirosis, una zoonosis que impacta a la salud: diagnóstico, tratamiento y nuevas alternativas de control

Leptospirosis a zoonosis that impacts health: diagnosis, treatment and new alternatives of control

Patricia Hernández-Rodríguez^{1*} <http://orcid.org/0000-0003-1730-9648>

Ludy Cristina Pabón¹ <https://orcid.org/0000-0002-8723-0436>

Martha Fabiola Rodríguez² <https://orcid.org/0000-0003-1237-9305>

¹Universidad de La Salle, Departamento de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia.

²Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias de la Salud. Bogotá, Colombia.

*Autor para la correspondencia: phernandez@unisalle.edu.co

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis con potencial epidémico y de difícil diagnóstico que requiere un manejo integral para orientar las medidas de prevención y control; sin embargo, una de las dificultades es la existencia de más de 300 serovares, la supervivencia de la bacteria en el ambiente por más de 180 días y la importancia del agua como vehículo de transmisión. Esto asociado con los efectos adversos de los antibióticos y su efecto sobre la multirresistencia generada por la mayoría de las bacterias, hace que se evalúen nuevas alternativas a partir de la biodiversidad. Por lo tanto, el objetivo de este artículo es abordar la leptospirosis y su diagnóstico enfatizando en el control convencional de la infección y las alternativas de tratamiento a partir del uso de plantas medicinales. Para esto se realizó una revisión exhaustiva de artículos en bases de datos. La información encontrada permitió establecer los aspectos relevantes de la enfermedad, su diagnóstico y tratamiento, tanto con antimicrobianos convencionales como frente a nuevas alternativas de origen natural. Se concluye que es importante realizar investigaciones orientadas hacia la búsqueda de principios activos que puedan contribuir al control de *Leptospira* spp., agente causal de la leptospirosis, una de las zoonosis más importantes por su impacto en salud humana, veterinaria y del ecosistema.

Palabras clave: leptospirosis; antimicrobianos naturales; susceptibilidad.

ABSTRACT

Leptospirosis is a potentially epidemic zoonosis of difficult diagnosis which requires comprehensive management to indicate appropriate prevention and control measures. However, some of the difficulties are the existence of more than 300 serovars, survival of the bacteria in the environment for more than 180 days, and the role of water as a route of transmission. The above situation, alongside the adverse effects of antibiotics and their effect on the multi-drug resistance developed by most bacteria, lead to the search for new alternatives based on biodiversity. The purpose of the study was therefore to address leptospirosis and its diagnosis highlighting conventional control of the infection as well as treatment options based on the use of medicinal plants. To achieve this end, an exhaustive review was conducted of papers included in databases. The information obtained made it possible to determine the relevant aspects of the disease, its diagnosis and its treatment with conventional antimicrobials as well as new alternatives of a natural origin. Conclusions point to the importance of conducting research aimed at the search for active principles potentially contributing to control of *Leptospira* spp., the causative agent of leptospirosis, one of the most relevant zoonoses in terms of its impact on the health of humans, animals and the ecosystem.

Keywords: leptospirosis; natural antimicrobials; susceptibility.

Recibido: 17/11/2019

Aceptado: 09/09/2020

Introducción

La leptospirosis es la zoonosis más extendida en el mundo y se considera como emergente, los brotes ocurren normalmente durante la época de lluvia en zonas tropicales que son altamente inundables.^(1,2,3) Se ha informado una alta seroprevalencia en poblaciones con actividades agrícolas, ganaderas y veterinarias en las zonas rurales;⁽⁴⁾ también, en grupos de riesgo como personal militar, mineros y trabajadores que eliminan aguas residuales y desechos.^(5,6)

Las manifestaciones clínicas van desde asintomáticas hasta infecciones severas y potencialmente mortales, que implican complicaciones renales, hepáticas y/o respiratorias.⁽⁷⁾ La presentación clínica de la enfermedad es bifásica, cuenta con una fase aguda de aproximadamente una semana, seguida de una fase inmune caracterizada por una producción de anticuerpos única y la excreción de leptospiras en la orina.^(3,8) La leptospirosis se asocia con varios síntomas clínicos como el inicio repentino de enfermedad febril, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, dolor abdominal y afectación conjuntival.⁽⁹⁾ Sin embargo, esta sintomatología es similar a la observada en: dengue, influenza, brucelosis, borreliosis, mononucleosis, malaria, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, rickettsiosis meningitis, neumonía, hepatitis, nefritis, pancreatitis y eritema.^(3,10,11) Entre los síntomas principales, severos y fatales de la leptospirosis se encuentra insuficiencia renal (20 %) e ictericia (60 %),⁽¹²⁾ donde este último juega un papel importante en la tasa de mortalidad que oscila entre 3 % al 70 %.⁽⁸⁾

Las estrategias de control para la leptospirosis se dirigen generalmente a cualquiera de los tres puntos nodales en el ciclo de transmisión de la enfermedad, es decir, los animales portadores, el ambiente o los seres humanos. En los países en desarrollo las estrategias tradicionales dirigidas a los roedores, los huéspedes del reservorio, los animales de granja, de compañía y el ambiente no son realizadas de manera frecuente. Adicionalmente, en muchos lugares de trabajo no se utilizan completamente las medidas de control como el uso de equipo de protección, debido a la falta de aceptación de la comunidad o por los costos económicos.⁽¹³⁾ Por lo tanto, este tipo de enfermedades bacterianas suelen ser abordadas mediante la prevención de brotes o por el tratamiento de la enfermedad con medicamentos o productos químicos^(14,15) penicilina G, doxiciclina, cefotaxima, ceftriaxona, azitromicina, eritromicina, amoxicilina y ampicilina^(2,16) y para animales se utiliza la clortetraciclina, sulfato de neomicina y la oxitetraciclina.⁽¹⁷⁾ La susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Leptospira* aisladas de humanos y animales productores de alimentos, de diversos orígenes geográficos no ha cambiado sustancialmente en los últimos años, frente a los antibióticos comúnmente utilizados para tratar esta enfermedad infecciosa, como la penicilina, amoxicilina, clavulanato, cefalexina, ceftriaxona, doxiciclina, tetraciclina, estreptomina, enrofloxacin y espectinomicina, tetraciclina y doxiciclina, como se demuestra en el estudio de Liegeon y colaboradores, el cual utilizó 35 cepas de *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira broomii*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii* y *Leptospira santarosai*, aisladas entre 1936 y 2016.⁽¹⁸⁾ La efectividad de estos antibióticos frente a las leptospiras ha sido demostrada por los cambios estructurales relacionados con

irregularidades en el enrollamiento, cambios en los ganchos, pérdida de la membrana externa, formación de vesículas de membrana y lisis completa de las células.⁽¹⁹⁾

El tratamiento de la leptospirosis es un problema emergente para la salud pública, debido a que tiene como inconvenientes: su alto costo, su tratamiento es casi siempre empírico debido a la falta de métodos diagnósticos rápidos y precisos⁽¹⁾ para instaurar el tratamiento indicado y evitar la generación de resistencia de las leptospiras frente a los antibióticos disponibles.^(3,10) La situación actual enfatiza en la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de control, entre los que se encuentra fármacos antileptospirales naturales. De esta manera, el objetivo de este artículo es abordar la leptospirosis y su diagnóstico enfatizando en el control convencional de la infección y las alternativas de tratamiento a partir del uso de plantas medicinales.

Métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva en bases de datos como Scopus, Science Direct, Pubmed y SciELO utilizando una ventana de tiempo de 10 años y mediante la estructuración de varias ecuaciones de búsqueda, que incluyeron palabras como antileptospiral, plantas, *Leptospira*, extractos, antimicrobianos, diagnóstico, prevención, control y tratamiento. Se identificaron artículos principalmente de investigación original que se seleccionaron para lectura y análisis de la información que se organizó en tres campos para el desarrollo del artículo: importancia de la leptospirosis, diagnóstico, tratamiento y nuevas alternativas de control de la zoonosis.

Leptospirosis

Leptospirosis es causada por espiroquetas del género *Leptospira*, que tiene una extensión de 6-20 μm y un diámetro de 0,1 μm ,⁽¹⁸⁾ son muy delgadas, bien enrolladas, que se caracterizan por una motilidad muy activa, tanto en rotación como en flexión. Por lo general, uno o ambos extremos de la bacteria están doblados o enganchados. La clasificación de este género en serovares (taxón básico) se hace sobre la base de la heterogeneidad estructural del antígeno O del lipopolisacárido (LPS); sin embargo, este proceso ha sido confuso y complicado, teniendo en cuenta la alta diversidad^(18,19) antigénica y genética.⁽⁸⁾ En la actualidad se informan más de 300 serovares y 66 especies diferentes.^(19,20,21) En este género

se incluye especies patógenas como *Leptospira interrogans* y especies no patógenas como *Leptospira biflexa*.⁽²⁾

Las especies patógenas pueden infectar humanos y animales;⁽²⁾ entre los que se encuentra, ovejas, cabras, perros, cerdos, caballos, pez cebra, cerdos, mapaches, roedores, equinos y búfalos, entre otros.^(10,11,18) Estas bacterias pueden entrar a través de la piel o membrana mucosa, especialmente si la piel tiene cortes o rasguños, al ingerir agua contaminada o sufrir salpicaduras de agua contaminada en la nariz o los ojos.⁽²²⁾ Se ha determinado que el período de incubación es de 3 a 7 días y que las bacterias aparecen en la sangre durante los primeros 7-10 días después de la infección por contacto directo de orina infectada o por contacto indirecto con suelo o agua contaminada con orina de roedores o animales infectados.^(2,10,18,23)

Epidemiológicamente se involucran reservorios o huéspedes de mantenimiento; en ellos la enfermedad es mantenida en la especie animal y su diseminación es principalmente por contacto directo, es subclínica, crónica con excreción prolongada de la bacteria (algunas veces dura toda la vida), frente a la cual el huésped genera una inmunidad no protectora.⁽²⁴⁾

La infección en huéspedes incidentales es más severa, con signos clínicos, fuerte respuesta inmune que es protectora contra nuevas exposiciones y con periodos cortos de leptospirosis.⁽¹⁵⁾

La importancia de esta enfermedad radica en que se informan más de 5.000.000 casos de leptospirosis grave, con tasas de letalidad superior al 10 o 20% cada año y se estima que la morbilidad anual de la leptospirosis es mayor en los países en desarrollo de Asia meridional y el Sudeste Asiático.⁽¹⁰⁾ La prevención de la infección mediante el control de los factores ambientales es difícil debido a que *Leptospira* puede sobrevivir al aire libre bajo condiciones favorables y tiene considerables repercusiones socioeconómicas en los países en desarrollo, en especial en el sector agropecuario.⁽¹⁸⁾ Adicionalmente, un tratamiento inadecuado de la enfermedad febril aguda conduce a disfunción hepatorenal y trastornos hemorrágicos que llevan a que esta infección sea importante en salud humana y veterinaria.^(10,11,12,13,14,15,22,25)

Diagnóstico

Leptospirosis puede ser diagnosticada mediante ELISA, prueba de aglutinación microscópica (MAT), prueba serológica, microscopía de campo oscuro (DFM) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁽²³⁾ Las técnicas más empleadas para el diagnóstico de leptospirosis son las pruebas serológicas, especialmente la prueba MAT; sin embargo, esta prueba es dispendiosa, necesita una colección de cepas para ser utilizadas como antígenos.

Además, la interpretación de los resultados es complicada por las frecuentes reacciones cruzadas entre los serogrupos y por la determinación del punto de corte que depende de la endemidad de la región para lo cual no existen criterios unificados, su sensibilidad varía entre 40 % y 89%, y su especificidad entre 86 % y 98 %, la cual depende del panel de serovares utilizados.⁽²⁶⁾ Se ha buscado ampliar la eficacia de la prueba MAT a partir de la inclusión de serogrupos aislados en las regiones con el fin de ampliar el panel diagnóstico para la MAT.⁽²⁷⁾ En un estudio realizado en Brasil en 314 bovinos, utilizando en la prueba MAT un panel de 21 cepas de referencia y 12 cepas locales, se estableció una seroreactividad con cepas locales de 65 % frente a 55 % con las cepas de referencia e igualmente se informó que para el primer caso el serogrupo más prevalente fue Grippotyphosa mientras que con las cepas de referencia la mayor prevalencia la obtuvo Sejroe.⁽²⁸⁾ Estos resultados han llevado a establecer la importancia de los aislamientos a nivel regional pues se han informado problemas de correspondencia entre los resultados serológicos y bacteriológicos.⁽²⁷⁾

El cultivo microbiológico confirma la presencia de la bacteria; sin embargo, se requiere una incubación de 4 a 6 semanas, presentando un bajo rendimiento y poca utilidad como prueba diagnóstica debido a que después de ese tiempo el paciente ya se encuentra en la fase aguda y convaleciente, llevando a que terapia inicial de la leptospirosis sea en muchas ocasiones empírica y no basada en un amplio diagnóstico diferencial con otras enfermedades febriles.⁽¹⁵⁾

Las pruebas moleculares como herramienta diagnóstica de leptospirosis presentan una alta especificidad⁽²⁹⁾ y tienen la ventaja de llevar a una identificación del agente de manera definitiva, sensible y específica en muestras de fluidos, incluso antes de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas convencionales; sin embargo, una limitante es la incapacidad para identificar el serovar infectante, que no es significativo para el manejo del paciente individual pero si tiene un valor epidemiológico y en salud pública.^(30,31)

Los estudios epidemiológicos de las cepas de *Leptospira* a nivel molecular también han demostrado que hay diferencias con la serotipificación, de igual forma el análisis de los test de susceptibilidad antimicrobiana también han encontrado diferencias en los serogrupos,⁽²⁷⁾ por lo cual se ha propuesto que los genes de resistencia ayuden a la tipificación de estas bacterias, debido a que la susceptibilidad antimicrobiana está directamente relacionada con el ambiente del huésped y la localización geográfica, principalmente debido a las discrepancias en el uso de los antimicrobianos en el mundo.

Tratamiento y control

La vacunación y la quimioprofilaxis son dos de las principales medidas de control para la leptospirosis; se han desarrollado vacunas para *L. interrogans* serovares como Hardjo, Pomona, Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae; sin embargo, están asociadas con desventajas como protección subóptima, requerimiento de dosis de refuerzo, insuficiencia contra el gran número de serovares circulantes y efectos secundarios. Adicionalmente, las vacunas tienen una disponibilidad limitada para ciertas áreas geográficas y cuenta con pocas licencias en países desarrollados.⁽¹⁸⁾

La leptospirosis por lo general responde al tratamiento con los antibióticos, siempre y cuando se administren en dosis suficientes antes de la infección aguda. Los tratamientos más empleados son los realizados con la penicilina de benzilo, la cual se debe administrar por vía intravenosa hasta por 7 días en una dosis diaria de 6-8 mega unidades (3,6-4,8 g), pero puede causar una exacerbación temporal de los síntomas. La tetraciclina se debe administrar si no hay evidencia de insuficiencia renal⁽¹⁸⁾ y la doxiciclina puede usarse para prevenir la infección, pero muestra algunos efectos secundarios como diarrea, náuseas, dolor abdominal, vómitos y puede causar decoloración dental si se usa en niños menores de los 8 años de edad.⁽³²⁾

La dificultad en el cultivo ha llevado a que no se realicen estudios de susceptibilidad frente a los antibióticos; sin embargo, se ha informado que la mayoría de los serovares de *L. interrogans*, *L. borpetersenii*, *L. kirschneri* y *L. weilii*, son sensibles a los antibióticos beta-lactámicos: penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulónico y ceftiofur.^(33,34) Las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxime, ceftriaxone y ceftiofur han sido preferencialmente utilizadas para el tratamiento de la leptospirosis en los últimos años.⁽³⁵⁾ Incluso hay informes que cefazolina una cefalosporina de primera generación, efectiva principalmente contra cocos Gram positivos (aunque es de amplio espectro), también presenta una baja concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a cepas de *Leptospira* spp.⁽³⁵⁾

Las leptospiras también son susceptibles a las quinolonas como ciprofloxacina y norfloxacina, con algunas variaciones en aislamientos informados en Brasil de *L. interrogans* serovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona y Grippotyphosa.⁽³⁶⁾ En este sentido, se han evidenciado diferencias en los resultados de susceptibilidad de los distintos serovares a los antimicrobianos,⁽³⁷⁾ posiblemente debido a cambios en la expresión de genes asociados con patogenicidad cuya expresión depende del reservorio y origen geográfico,⁽³⁸⁾

lo cual demuestra la importancia de mejorar las técnicas de identificación y de susceptibilidad a nuevos antimicrobianos frente a los convencionales.

Los ensayos clínicos de agentes antimicrobianos contra *Leptospira* son limitados a penicilina, doxicilina y ceftriazona, documentándose que estos antibióticos mejoran los signos clínicos, incluyendo la resolución de la fiebre y la leptospiuria.⁽³⁹⁾ *In vitro* se ha demostrado que el 90 % de 26 cepas de *Leptospira* fueron inhibidas (CMI 90) por cefepima, imipenem-cilastatina, eritromicina, claritromicina y telitromicina a una concentración menor de 0,01 g/mL. La CMI: 90 de amoxicilina aztreonam, cloranfenicol y penicilina G fue mayor de 3,13 g/mL.^(40,41)

La mayoría de los serovares de *Leptospira* son sensibles a las quinolonas como ciprofloxacina y norfloxacina,^(34,36) solo, se ha informado alta variabilidad en las concentraciones de la CMI de las fluoroquinolonas en aislados de *L. interrogans* serovar Copenhageni.⁽³⁶⁾ En Brasil también se han informado valores elevados en la CMI de Enrofloxacin (0,5 mg/L-8,0 mg/L) en los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, y Grippotyphosa, este último el más resistente, con valores de CMIC de 8,0 mg/L.⁽³⁶⁾

La resistencia más documentada de la mayoría de serovares de *Leptospira* es frente a los antibióticos comúnmente utilizados en los cultivos: 5 fluorouracil, fosfomicina y vancomicina. Otros estudios, han informado algunos serovares resistentes a antibióticos de uso clínico como neomicina, trimetoprima/sulfametoxazol y sulfadimetoxina.^(34,36,37) La resistencia a los aminoglucósidos es variable en serogrupos de *Leptospira* principalmente a neomicina y estreptomina.⁽⁴²⁾ Se han informado valores elevados de la CMI de estos antibióticos frente a *L. interrogans* serovar Pomona y *L. santarosai* serovar Grippotyphosa siendo esta última la más resistente.⁽³⁶⁾

Nuevas alternativas de tratamiento

La leptospirosis al ser una zoonosis con amplia distribución puede afectar a personas que viven en regiones apartadas donde la cobertura sanitaria es limitada y/o las condiciones para acceder a tratamientos convencionales son reducidas o en el caso de utilizarlos se presentan efectos adversos y los costos también son una limitante.⁽⁴³⁾ Por lo tanto, es necesario aportar en la búsqueda de nuevos antimicrobianos de bajo costo, con menor toxicidad y mayor eficacia.^(44,45) En este sentido, una alternativa para el control, es el uso de sustancias antimicrobianas basadas en plantas, las cuales se han utilizado desde la antigüedad y se informa que el 80 % de la población indígena utiliza la medicina tradicional.^(18,43,44) Sin

embargo, los informes de nuevos agentes antileptospirales naturales son limitados; así como, los que estudian los posibles mecanismos de acción.

Extractos vegetales

En general, se identificaron informes que evalúan la actividad biológica, especialmente la CMI y otros el potencial antileptospiral *in vitro* basados en la medicina tradicional. En este sentido, se encontró que un extracto crudo del mangostino (*Garcinia mangostana*) presentó actividad antileptospiral frente *L. interrogans* serovares Bataviae, Autumnalis y Javanica, con CMI entre 200-400 µg/mL.⁽²⁾ Una fracción purificada de *Asparagopsis taxiformis* presentó potencial inhibitorio frente a cepas patógenas de *Leptospira* de 14 serovares y 11 aislamientos del serovar Javanica y Borgpetersenii con un intervalo de CMI 100-400 µg/mL, mientras que la penicilina y doxiciclina presentaron un intervalo de 25-200 µg/mL. En relación con la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó que la fracción de *A. taxiformis* estuvo en un rango entre 400-1600 µg/mL frente a los serovares de *Leptospira* evaluados, comparados con el intervalo de 100-400 µg/mL obtenido para doxiciclina y 50/100 µg/mL para la penicilina.⁽¹⁵⁾

La mayoría de los estudios han sido realizados con plantas utilizadas en la medicina tradicional como *Zingiber officinale*, *Ocimum sanctum* y *Piper nigrum* contra varios serogrupos de *Leptospira* como Australis, Pomona, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Copenhageni y Semarang. El extracto acuoso y aceite volátil de las hojas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng; (Lamiaceae) sobre cultivos de *L. biflexa*,⁽⁴⁶⁾ mostraron que tanto el extracto acuoso como el aceite volátil eran eficaces a concentraciones de 50 000 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente.⁽⁴⁷⁾

En otro estudio realizado con plantas de la medicina tradicional de la India fueron obtenidos extractos metanólicos de las hojas de *Glyptopetalum calocarpum* obteniendo CMI de 200-400 µg/mL y CMB de 800 µg/mL frente a cepas patógenas de leptospiras pertenecientes a 10 serovares.⁽¹⁾

Los extractos acuosos de *Eclipta alba* (Asteraceae) presentaron 100% de inhibición a 50 µg/mL frente a los serovares Australis, Autumnalis y Grippytyphosa, mientras que los extractos etanólicos a la misma concentración presentaron 80% de inhibición frente al serovar Icterohaemorrhagiae y los tres anteriores.⁽⁹⁾ En el extracto metanólico de *Boesenbergia rotunda* se encontró que la CMI, frente a 24 cepas patógenas de *Leptospira*, oscilo entre 62,5 a 125 µg/mL y las CMB se encontraron entre 250 a 500 µg/mL.

Adicionalmente, el extracto bruto se sometió a estudios citotóxicos y se encontró que tenía una actividad hemolítica despreciable, presentando valores de CI_{50} superiores a 4 mg/mL.⁽⁸⁾ Al evaluar los extractos de cloroformo de hojas de *Piper betle* L., (Piperaceae) frente a 10 serovares de *Leptospira* se observó un efecto inhibitorio con CMI y CMB entre 200 a 400 µg/mL, siendo los serovares más susceptibles Autumnalis, Javanica, Sejroe, Icterohaemorrhagiae y Patoc. Adicionalmente, se determinó que al cabo de 10 h y 12 h para el serovar Icterohaemorrhagiae y Autumnalis, respectivamente, se presenta el efecto bactericida a una concentración de 200 µg/mL. Al evaluar los cambios postratamiento, se determinó un aumento en la permeabilidad celular al yoduro de propidio, debido a una alteración en la integridad de la membrana, lo que indicó así que este efecto podía ser el modo de acción probable del extracto clorofórmico de *P. betle*. Esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional al presentar actividades antimicrobianas, antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas.⁽⁴⁴⁾

En plantas como *Andrographis paniculata*, *Azadirachta indica*, *Phyllanthus niruri* y *Adhatoda vasica*, utilizadas en medicina tradicional, se ha determinado el potencial antileptospirosis de los extractos. De las cuatro plantas, los extractos metanólicos y etanólicos de *A. vasica* y *A. paniculata* exhibieron la mejor actividad antileptospirosis, los cuales a todas las concentraciones evaluadas inhibieron la motilidad de *L. interrogans*, mientras que los extractos de *P. niruri* fueron capaces de reducir la actividad de la cepa, solo en las concentraciones más altas (100 mg/mL y 1 000 mg/mL). Adicionalmente, este estudio permitió determinar que la CMI del extracto metanólico de *A. vasica* fue de 25 mg/mL, una concentración que induce cambios celulares, daños severos en la arquitectura celular de *L. interrogans* y pérdidas del cuerpo de inclusión responsable de la virulencia; estos cambios confirman la acción *A. vasica* sobre *L. Interrogans*.⁽⁵⁾ Otra planta con efectos similares es *Quercus infectoria* una especie que ha presentado actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un amplio espectro de microorganismos incluidos multiresistentes. Mustafa y otros⁽⁴⁸⁾ determinaron la actividad antimicrobiana del extracto acuoso contra *L. Interrogans* serovar Javanica y *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae con valores de CMI de 0,125 mg/mL para los dos serovares y valores de CMB de 0,125 mg/mL y 0,250 mg/mL, respectivamente. La presencia de taninos hidrolizables como el pirogalol puede prevenir la adherencia de las bacterias a la célula huésped, debido a que tienen una estructura similar a los receptores de unión a bacterias que están presentes en las células del tracto urinario. Por tanto, los efectos observados en este estudio sobre los cambios estructurales de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae pueden ser el resultado de la acción del pirogalol.⁽⁴⁸⁾

Al evaluar por PCR el efecto del extracto de *Phyllanthus amarus* sobre el gen *sphH* (esfingomielinasa) se determinó que los productos amplificados de leptospiras expuestas al extracto de la planta no presentaban la banda de ADN específica para el gen *sphH*; la cual si fue evidenciada en las muestras no tratadas. Por lo tanto, el extracto de *P. amarus* se identificó como una nueva fuente de antileptospirales.⁽³²⁾ Esta actividad también ha sido evaluada con fármacos como Siddha Seenthil sarkarai y Nilavembu kudineer que han mostrado inhibición completa de *Leptospira* con diluciones de 500 µL de Seenthil sarkarai y 2,5 mL de Nilavembu kudineer.⁽¹⁸⁾

En las plantas medicinales de la India *E. alba* (Asteraceae) y *P. amarus* (Euphorbiaceae), comúnmente llamadas Bhringaraj y Bahupatra o rompepiedra respectivamente,⁽¹⁸⁾ se evaluaron cinco extractos con hexano, cloroformo, metanol, agua fría y caliente; sin embargo, a los de metanol y agua se les evaluó el potencial antileptospiral mediante la exposición de los extractos metanólicos de las plantas sobre el ADN del serovar *Icterohaemorrhagiae* observando la escisión del ADN a una concentración 1 µg/mL. Los extractos de ambas especies a una concentración de 25 µg/mL mostraron una actividad antileptospiral importante frente a los serovares *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona* y *Hardjo*, mientras que se requirió una concentración de 50 µg/mL del extracto metanólico para presentar el mismo efecto de inhibición frente al serovar *Javanica* y ninguno de los extractos inhibió los serovares *Autumnalis*, *Pyogens* y *Australis*.⁽¹⁸⁾ Para el extracto metanólico de *P. amarus* en otros estudios, se ha identificado que los compuestos mayoritarios son Bufalina (esteroide cardiotónico), Tetratetracontano y α -Tocoferol;⁽⁴⁹⁾ así como, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, isoquercitrina, quercitrina, rutósido, hispidulina, acacetina, casticina, estigmasterol, beta-sitosterol y campesterol.⁽⁵⁰⁾

Adicionalmente, se ha propuesto evaluar tratamiento combinados. Por ejemplo, en un estudio se investigó el potencial antileptospiral de cinco extractos crudos de plantas (*Curcuma zedoaria* (rizomas), *Gymnopetalum cochinchinense* (frutos), *Terminalia chebula* (agallas), *Piper sarmentosum* (hojas) y *Tinospora crispa* (tallos)) y su efecto sinérgico con ampicilina contra leptospiras patógenas (cinco serovares patógenos de *Leptospira* serovar *Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Pyrogenes*, *Ranarum* y *Sejroe* y no patógenas *L. biflexa*). Aunque todos los extractos fueron capaces de inhibir el crecimiento de leptospiras con valores diferentes de CMI, el extracto de *T. chebula* mostró el mayor potencial antileptospiral con la CMI variando de 0,0098-0,625 mg/mL mientras que el resto de los extractos dio la CMI de 0,078 a > 2,5 mg/mL. Adicionalmente, se observó sinergismo y sinérgia parcial con un índice FIC de 0,318 y 0,57 cuando se mezcló este extracto con ampicilina contra *L.*

interrogans serovar Hebdomadis y Sejroe, respectivamente y un efecto antagónico contra *L. interrogans* serovar Autumnalis. La sinergia del extracto crudo y la ampicilina puede mejorar la eficacia del fármaco para el tratamiento de la leptospirosis.⁽⁵¹⁾

Asimismo, se evaluaron propiedades antileptospirales de extractos acuosos y etanólicos de *Trigona thoracica* frente a serovares patógenos (Australis, Bataviae, Canicola y Javanica), así como sus efectos sinérgicos al mezclarse con los antibióticos comúnmente prescritos para la leptospirosis, doxiciclina, ceftriaxona y penicilina G. La CMI de todos los extractos acuosos frente a los serovares evaluados fue de 6,25 mg/mL mientras que la CMB en general fue de 12,5 mg/mL, excepto frente al serovar Australis fue de 25 mg/mL. Los extractos etanólicos presentaron un mayor potencial al presentar valores de CMI de 0,79 mg/mL frente al serovar Bataviae y 1,57 mg/mL para los otros serovares y una CMB de 1,57 mg/mL frente a todos los serovares analizados. En el estudio de sinergia se determinó que solo se presentó un efecto sinérgico (FIC de 0,38) en la combinación del extracto acuoso con penicilina G contra el serovar Australis. Los efectos aditivos se detectaron para las combinaciones del extracto acuoso con penicilina G y con doxiciclina frente a *L. interrogans* serovar Bataviae y Canicola. Se observaron cambios morfológicos como menos espirales y ausencia de los ganchos en los extremos en las leptospiras tratadas. En general, para los propóleos se han propuesto varios mecanismos de acción como antibacterianos que incluye inhibición de la división celular bacteriana, alteración de la pared celular e inhibición de la motilidad bacteriana. De esta manera, el propóleo de *T. thoracica* podría potencialmente usarse como un agente terapéutico complementario o alternativo contra *Leptospira* spp.⁽⁵²⁾ Los resultados de actividad antileptospiral muestran en su mayoría que el rango de concentraciones de las sustancias activas se encuentra entre 50 y 1000 µg/mL, observándose diferencias en la susceptibilidad de los diferentes tipos de serovares, lo que implica que la naturaleza antigénica, los restos proteicos superficiales y el lipopolisacárido de *Leptospira* tienen una amplia variación entre los diferentes serovares.⁽¹⁵⁾ Teniendo en cuenta el tipo de extractos que han mostrado actividad, se puede sugerir que los compuestos de alta polaridad como los polifenoles generan cambios en la permeabilidad celular, inactivación de enzimas, efectos tóxicos y desnaturalizan las proteínas.^(53,54)

Principios activos

Se ha evaluado la actividad antileptospiral de moléculas orgánicas tales como triterpenos, derivados de quinoxalina, xantonas, azometinas de aril oxazol y pseudopéptidos. De esta manera, se aislaron seis compuestos de las hojas de *G. calocarpum* para evaluar su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Leptospira*. De los seis compuestos (α -lupina (1), lupeol

(2), lupenona (3), estigmasterol (4), β -amirina (5) y acetato de β -amirina (6)) solo lupenona y estigmasterol mostraron actividad antileptospirotal. Las CMI de los dos compuestos ensayados frente a cepas patógenas de *Leptospira* pertenecientes a 10 serovares estuvieron en el intervalo de 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el rango de CMB fue de 400-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁽¹⁾

El estudio realizado con cinco xantonas purificadas de extractos crudos de *G. mangostana* permitió determinar actividades antileptospirotas de los compuestos frente a los serovares de *Leptospira* evaluados, *L. biflexa* serovar Patoc y *L. interrogans* serovares Bataviae, Autumnalis, Javanica y Saigon, con CMI que varían de 100 a 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Entre las xantonas purificadas la garcinona C fue el compuesto más activo para la *Leptospira* patógena (CMI= 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y no patógena (CMI= 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sin embargo, estos valores fueron superiores a los de los antibióticos tradicionales empleados para el control de este microorganismo como penicilina G, amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, cefepima, cloranfenicol, doxiciclina, eritromicina y tetraciclina con valores de CMI= 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; <0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$; <0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Así mismo, en este estudio se determinó la sinergia entre la γ -mangostina y la penicilina G como inhibidores del crecimiento de *Leptospira*, encontrándose que combinaciones de γ -mangostina con penicilina G generaron efecto sinérgico contra *L. interrogans* serovar Bataviae, Autumnalis y Javanica (FIC= 0,52; 0,50 y 0,04, respectivamente), ninguna interacción contra *L. biflexa* serovar Patoc (FIC= 0,75) y un efecto antagonista (FIC= 4,03) frente a *L. interrogans* serovar Saigon. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron concluir que la garcinona C y la γ -mangostina pertenecen a las xantonas 1,3,6,7-tetraoxigenada y son las que presentan una mayor actividad inhibitoria.⁽²⁾

Se ha incentivado la búsqueda de inhibidores de enzimas como la 3-metil-9-ADN-glucosilasa I (LiTagA), que excita 3-metiladenina y 3-metilguanina del ADN alquilado, un componente indispensable para la supervivencia de *Leptospira* spp, la ausencia de la enzima en humanos la hace un objetivo quimioterapéutico prometedor para tratamientos antileptospirotas. En un estudio realizado por Rajesh & Sivaraman,⁽³⁾ se tomaron 200 inhibidores novo de esta enzima, los cuales fueron examinados por medio de PyRx, una herramienta de cribado virtual de alto rendimiento y AutoDock. El análisis combinado de los datos reveló pocos inhibidores de novo eficaces sobre la enzima LiTagA de *Leptospira interrogans* y con la evaluación de la biodisponibilidad y toxicidad se encontró solo un compuesto de novo como un inhibidor eficaz de la enzima LiTagA, convirtiéndose en un

blanco prometedor para desarrollo de un fármaco terapéutico contra la leptospirosis cuya validación experimental está en proceso.⁽³⁾

Algunos estudios han avanzado hacia la obtención de blancos terapéuticos, *Ilangovan* y otros⁽¹⁰⁾ evaluaron la actividad antileptospirosis a partir de la síntesis de una variedad de compuestos tipo piranoisoxazolona y dihidronaftopiran-4-ona (DHNP); obteniendo, 10 piranoisoxazolona 21-30 y seis dihidronaftopiran-4-ona (DHNP) 31-36 (Fig. 1). Nueve compuestos presentaron inhibición frente a *L. interrogans* serovar Autumnalis, siete de ellos el 22, 24, 26, 27, 30, 35, 36 inhibieron a 250 mg/mL y el 29 y 34 a 500 mg/mL. La mayoría de estos compuestos mostraron actividad a una concentración igual que la doxiciclina (250 mg/mL) y los autores sugieren que los compuestos 35 y 36, al tener un anillo de naftilo no sustituido, eran moléculas potenciales para conseguir una actividad antileptospirosis en comparación con los compuestos 31-33 cuyos anillos estaban sustituidos con el grupo OMe (Fig. 2).

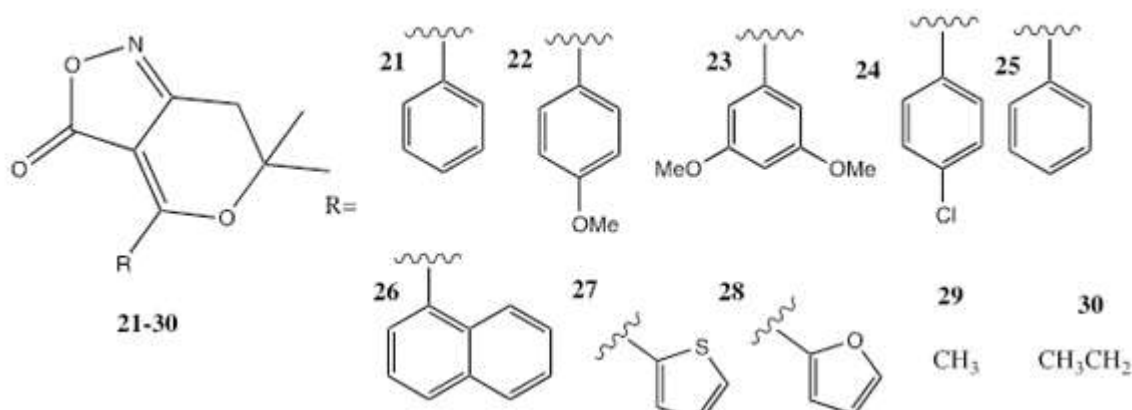
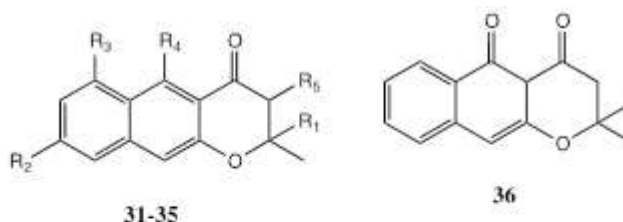


Fig. 1 – Diez piranoisoxazolona con actividad antileptospirosis.



	R1	R2	R3	R4
31	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
32	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
33	H	OCH ₃	OCH ₃	H
34	CH ₃	H	H	H
35	H	H	H	H

Fig. 2 - Seis dihidronaftopiran-4-ona con actividad antileptospirosis.

Adicionalmente, determinaron que las seis pirano [4,3-c] isoxazol-3-onas que presentaron actividad estaban sustituidas en la posición 4 con una variedad de grupos tales como arilo, heteroarilo y alquilo, por lo que fueron tomadas para realizar un cribado secundario frente a trece diferentes serovares (doce patógenas y una no patógena).⁽¹⁰⁾ Los resultados de este estudio permitieron identificar relaciones de estructura actividad en la inhibición de serovares por seis pirano [4,3-c] isoxazol-3-onas. Los seis compuestos probados inhibieron las especies de *L. interrogans* serovar Bataviae, Canicola, Hebdomadis e Icterohaemorrhagiae a una CMI <250 mg/mL. Un compuesto con sustituyente 4-tiofenilo mostró actividad frente a todos los serovares a CMI < 250 mg/mL y particularmente contra Canicola a una CMI más baja 62,5 mg/mL, incluso menor a la concentración del antibiótico de referencia empleado (doxiciclina). Sin embargo, en el caso de los serovares Javanica y Sejroe los seis compuestos mostraron actividad solo a CMI > 250 mg/mL. Por lo tanto, la relación de actividad estructura de los compuestos muestra que los sustituyentes en la posición 4 de la piranoisaxazolona tiene una influencia importante sobre la actividad frente a los serovares de *Leptospira* spp, y el compuesto con un sustituyente tionilo tiene un potencial aun mayor, el cual fue confirmado por el ensayo de RT-qPCR que evaluó el potencial frente a los ácidos nucleicos.⁽¹⁰⁾ Los autores con el fin de establecer el mecanismo de acción del compuesto 27, propusieron en este mismo estudio realizar pruebas complementarias tales como supervivencia de los animales (*in vivo*), citotoxicidad (MTT), ensayo de muerte celular (tinción PI) y hemocompatibilidad. Estas pruebas permitieron determinar que mediante la utilización de este compuesto a una concentración de 20 mg/kg, los ratones infectados podrían protegerse de la leptospirosis, teniendo en cuenta que el 95 % de los ratones sobrevivieron y no hubo colonización de leptospiras en tejido renal.⁽¹⁰⁾ Adicionalmente, se realizó un *docking in silico* identificando una buena afinidad del compuesto con LipL32, una lipoproteína de membrana externa que es altamente conservada en leptospiras patógenas, explicando la especificidad del compuesto en cepas patógenas de *Leptospira* spp.⁽¹⁰⁾

Otro trabajo relacionado con síntesis de agentes antileptospirales fue realizado con nuevos derivados de base de Schiff (Figura 3) obtenidos a partir de reacciones de condensación entre (E)-3-(4-o-3-aminofenilimino) quinoxalina-2 (3H)-ona y aldehídos aromáticos, además de evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad antileptospiral frente a *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. Se encontró inhibición del serovar Icterohaemorrhagiae por la mayoría de compuestos; especialmente, el 37, 38, 40, 43, 44 y 46 afectaron la motilidad de las espiroquetas con porcentajes inferiores a los obtenidos con la penicilina G y el 44

mostró la mayor actividad⁽²³⁾ (Tabla) al igual que los compuestos que llevan un sustrato de atracción de electrones en el anillo fenilo. Los compuestos 38 y 44 al presentar un grupo nitro en la posición meta del anillo de fenilo, son considerado como blancos terapéuticos con una actividad significativa. Los compuestos 40 y 46 al presentar un ácido carboxílico en el anillo de fenilo y los compuestos 37 y 43 que poseen un átomo de cloro también podrían ser considerados como agentes antileptospirales.⁽¹⁶⁾

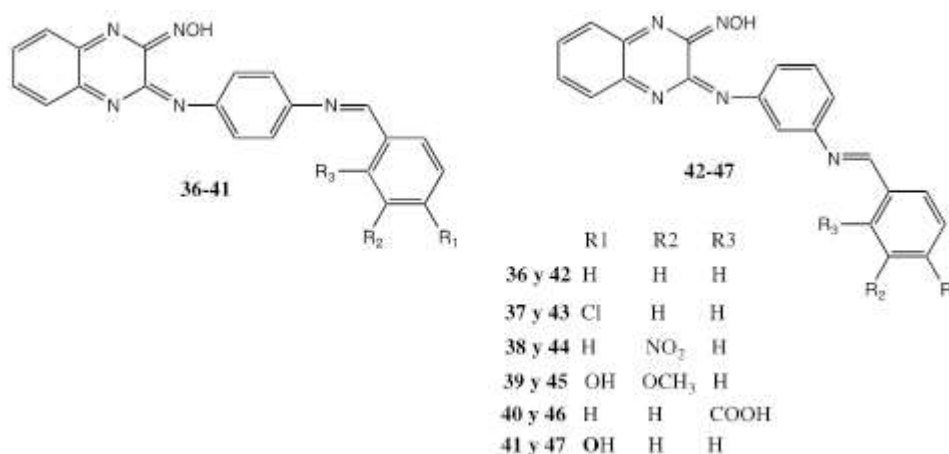


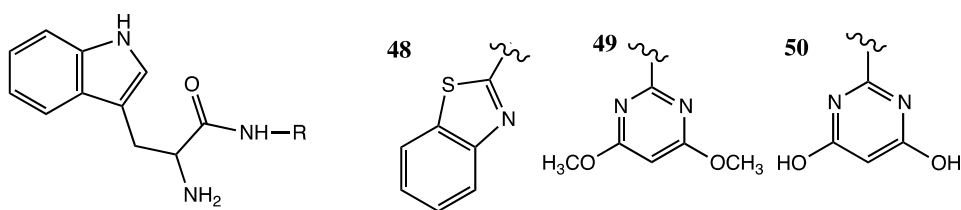
Fig. 3 - Derivados de base de Schiff con potencial antileptospiral.

Tabla - Porcentajes de inhibición de la motilidad de derivados de base de Schiff

Compuesto	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	PG
% IM	26,1	81,5	90,4	28,6	73,2	52,7	32,4	83,6	91,2	42,1	70,5	51,4	94,1

* Porcentaje de inhibición de la motilidad. **PG: penicilina G.

Los pseudopéptidos son otro tipo de compuestos probados para determinar la actividad antileptospiral; Shivamallu y otros⁽⁴⁶⁾ sintetizaron pseudopéptidos de triptófano determinando que los compuestos 48-50 mostraron una actividad inhibidora eficaz frente a *L. interrogans* serovar Icterohemorragiae, Canicola y Pomona, con inhibición de la motilidad a la concentración más baja de 15 µg/mL, mientras que para Javanica este efecto fue a 50 µg/mL, y el compuesto 50 fue el único que inhibió totalmente al serovar Autumnalis a una concentración de 100 µg/mL (Fig. 4).⁽⁴⁶⁾



48-50

Fuente: Shivamallu C, Sharanaiah U, Kollur SP, Mallesh NKR, Hosakere RD, Balamurugan V. Pseudo-peptides as novel antileptospiral agents: Synthesis and spectral characterization. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc [Internet]. 2014 Jan 24 [access: 04/04/2018];118:1152-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184586>

Fig. 4 - Estructura de pseudopéptidos con potencial antileptospiral.

El estudio de sustancias naturales con actividad antileptospiral se ha fortalecido gracias a investigaciones en sinergia, docking molecular y relación estructura actividad que han permitido ampliar el espectro antimicrobiano y por ende estas sustancias puedan ser utilizadas como alternativas de control limitando el consumo de antibióticos y por consiguiente efectos secundarios como diarrea, hipersensibilidad, náuseas, erupción cutánea, neurotoxicidad y urticaria entre otros.⁽²⁾

Conclusiones

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis con mayor distribución e importante en salud pública, ha ocupado el segundo lugar dentro de las zoonosis asociadas con la pobreza por su impacto en salud humana, en el sector ganadero y agrícola; en este sentido, enfocar su tratamiento y control de manera integral es una necesidad que debe orientar las futuras investigaciones con el fin de minimizar el impacto en salud pública. Adicionalmente, los productos derivados de plantas medicinales ofrecen un menor costo, seguridad, presentan menores efectos secundarios y son una alternativa promisoriosa para ampliar el espectro de los tratamientos antileptospirales.

Todos los autores aportaron en la Concepción, diseño, obtención, análisis e interpretación de la información; así como en la elaboración, revisión y aprobación final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

1. Punnam Chander M, Vinod Kumar K, Shriram AN, Vijayachari P. Anti-leptospiral activities of an endemic plant *Glyptopetalum calocarpum* (Kurz.) Prain used as a medicinal plant by Nicobarese of Andaman and Nicobar Islands. Nat Prod Res [Internet]. 2015 Aug

- 18 [access: 04/04/2018];29(16):1575-7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2014.985679>
2. Seesom W, Jaratrungtawee A, Suksamrarn S, Mekseepralard C, Ratananukul P, Sukhumsirichart W. Antileptospiral activity of xanthones from *Garcinia mangostana* and synergy of gamma-mangostin with penicillin G. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2013 Dec 19 [access: 05/04/2018];13(1):182. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866810>
3. Rajesh SS, Sivaraman T. Cheminformatic designing of de novo inhibitors to 3-methyl adenine DNA glycosylase I (LiTagA) from *Leptospira interrogans* serovar lai strain 56601. *Med Chem Res* [Internet]. 2013 Jul 23 [access: 05/04/2018];22(7):3434-43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-012-0346-x>
4. Carvalho M da C, Ribeiro-Andrade M, de Oliveira PRF, de Melo RPB, Aragão BB, Viana MP, et al. Serological evidence of *Leptospira* sp. in humans from Fernando de Noronha Island, Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 [access: 05/12/2020];71:101486. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957120300758>
5. Jeyakumar N, K C, AJA, Ranjit S, C P, Beaula H. Cytomorphological Changes and Inhibition of Inclusion Body Formation in *Leptospira interrogans* on Treatment with the Extracts of *Adhatoda vasica*. *Adv Tech Biol Med* [Internet]. 2013 [access: 05/04/2018];1. Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/atbm.1000101>
6. Jittimane J, Wongbutdee J. Prevention and control of leptospirosis in people and surveillance of the pathogenic *Leptospira* in rats and in surface water found at villages. *J Infect Public Health*. 2019 Sep 1;12(5):705-11.
7. LERG. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group [Internet]. World Health Organization. 2011 [access: 05/04/2018] . Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44588/9789241501521_eng.pdf;jsessionid=DCE2C96457C6990AE15CBAF8F981E498?sequence=1
8. Chander MP, Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vijayachari P. GC/MS profiling, in vitro anti-leptospiral and haemolytic activities of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. used as a medicinal plant by Nicobarese of Andaman and Nicobar Islands. *Nat Prod Res* [Internet]. 2016 May 18 [access: 04/04/2018];30(10):1190-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26114982>

9. Prabhu N, Innocent JP, Chinnaswamy P, Natarajaseenivasan K, Sarayu L. In vitro Evaluation of *Eclipta alba* against Serogroups of *Leptospira interrogans*. Indian J Pharm Sci [Internet]. 2008 Nov [access: 05/04/2018];70(6):788-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21369443>
10. Ilangovan A, Sakthivel P, Sivasankari K, Mercy CSA, Natarajaseenivasan K. Discovery of 6,7-dihydro-3H-pyrano[4,3-c]isoxazol-3-ones as a new class of pathogen specific anti-leptospiral agents. Eur J Med Chem [Internet]. 2017 Jan 5 [access: 05/04/2018];125:29-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27643561>
11. Amarasiri A, Attanayake AP, Jayatilaka K, Mudduwa L. Acute nephroprotective and antioxidant activities of aqueous leaf extract of *Plectranthus amboinicus* (Roxb.) grown in Sri Lanka. ~ 155 ~ J Pharmacogn Phytochem [Internet]. 2018 [access: 20/08/2020];7(4):155-61. Available from: <http://www.phytojournal.com/archives/?year=2018&vol=7&issue=4&ArticleId=4892>
12. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 2;9(10).
13. Waggoner JJ, Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis [Internet]. Vol. 29, Current Opinion in Infectious Diseases. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [access: 19/08/2020]. p. 440-5. Available from: </pmc/articles/PMC5127924/?report=abstract>
14. Warnasekara J, Koralegedara I, Agampodi S. Estimating the burden of leptospirosis in Sri Lanka; A systematic review. BMC Infect Dis [Internet]. 2019 Feb 6 [access: 19/08/2020];19(1):119. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3655-y>
15. Vitale M, Agnello S, Chetta M, Amato B, Vitale G, Bella CD, et al. Human leptospirosis cases in Palermo Italy. The role of rodents and climate. J Infect Public Health [Internet]. 2018 Mar 1 [access: 19/08/2020];11(2):209-14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802826/>
16. Liegeon G, Delory T, Picardeau M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of *Leptospira*. Int J Antimicrob Agents. 2018 May 1;51(5):693-9.
17. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Saito M, Gloriani NG, Yoshida SI. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. Microbiol Immunol. 2011 Jul;55(7):494-501.
18. Adolor OE, Onyesom I, Opajobi AO, Mordi JC. Evaluation of Median Lethal Dose and Subchronic Oral Toxicity Assessment of Ethanolic Leaf Extract of *Phyllanthus amarus*. J

- Pharm Res Int [Internet]. 2019 [access: 20/08/2020];26(4):1-8. Available from: <http://journaljpri.com/index.php/JPRI/article/view/30145>
19. Caimi K, Ruybal P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;81:104241.
20. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. Martins EAL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 May 23 [access: 17/08/2020];13(5):e0007270. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
21. 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 genomics* [Internet]. 2018 Jan 1 [access: 17/08/2020];4(1):e000144. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000144>
22. Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert M-E, Rettinger A, Douyère A, et al. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [access: 17/08/2020];9:816. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00816>
23. Gopi C, Sastry VG, Dhanaraju MD. Microwave-assisted synthesis, structural activity relationship and biological activity of some new quinoxaline Schiff base derivatives as highly potent spirochete bactericidal agents. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* [Internet]. 2017 Mar 1 [access: 04/04/2018];6(1):39-47. Available from: <https://www-sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S2314853516300774>
24. Challa S, Nally JE, Jones C, Sheoran AS. Passive immunization with *Leptospira* LPS-specific agglutinating but not non-agglutinating monoclonal antibodies protect guinea pigs from fatal pulmonary hemorrhages induced by serovar Copenhageni challenge. *Vaccine* [Internet]. 2011 Jun 15 [access: 04/04/2018];29(27):4431-4. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549788>
25. Simpson GJG, Quan V, Freaan J, Knobel DL, Rossouw J, Weyer J, et al. Prevalence of Selected Zoonotic Diseases and Risk Factors at a Human-Wildlife-Livestock Interface in Mpumalanga Province, South Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2018 Jun 1 [access: 19/08/2020];18(6):303-10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29664701/>

26. Rajapakse S, Rodrigo C, Handunnetti SM, Fernando DD. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: Diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity [Internet]. Vol. 14, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. BioMed Central Ltd.; 2015 [access: 18/08/2020]. p. 2. Available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/14/1/2>
27. Martins G, Lilenbaum W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. Vol. 112, Research in Veterinary Science. Elsevier B.V.; 2017. p. 156-60.
28. Pinto PS, Loureiro AP, Penna B, Lilenbaum W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Acta Trop [Internet]. 2015 Sep 1 [access: 18/08/2020];149:163-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25997883/>
29. 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 [Internet]. 2011 Jan [access: 04/04/2018];84(1):1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047532>
30. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol [Internet]. 2015 [access: 18/08/2020];387:65-97. Available from: </pmc/articles/PMC4442676/?report=abstract>
31. Ospina-Pinto MC, Rincón-Pardo M, Soler-Tovar D, Hernández-Rodríguez P. Alteration of the reproductive indicators by the presence of *Leptospira* spp. in sows of swine farms. Acta Sci Vet [Internet]. 2019 Jan 1 [access: 18/08/2020];47(1):1628. <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/89894>
32. Saravanan R, Saradhai P, Rani E. Effect of *Phyllanthus amarus* extract on SphH gene of *Leptospira autumnalis* studied by an in-house PCR. INDIAN J Appl Microbiol [Internet]. 2012 [access: 18/08/2020];15:5. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Manikandan_Natesan2/publication/262046893_In_vitro_Antibacterial_activity_of_Cardiospermum_halicacabum_extracts_against_Bacterial_isolates_from_Pus_samples/links/004635367aea2b9816000000/In-vitro-Antibacterial-activity
33. 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 Nov;77(3):195-9.

34. Wuthiekanun V, Amornchai P, Langla S, White NJ, Day NPJ, Limmathurotsakul D, et al. Antimicrobial disk susceptibility testing of leptospira spp. Using leptospira vanaporn wuthiekanun (LVW) agar. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(2):241-3.
35. Harris BM, Blatz PJ, Hinkle MK, McCall S, Beckius ML, Mende K, et al. In vitro and in vivo activity of first generation cephalosporins against *Leptospira*. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(5):905-8.
36. Moreno LZ, Miraglia F, Lilenbaum W, Neto JSF, Freitas JC, Morais ZM, et al. Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing--a continuous attempt at species and serovar differentiation. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2016 Mar 9 [access: 04/04/2018];5(3):e17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956446>
37. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Gloriani NG, Yoshida S-I. In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents 2 3. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 [access: 04/04/2018]; Available from: <http://aac.asm.org/>
38. Boss J, Dance DAB, Chanthongthip A, Newton PN, Wuthiekanun V, Robinson MT. Antimicrobial susceptibility testing of *Leptospira* spp. In the Lao People's democratic Republic using disk diffusion. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 Mar 18 [access: 19/08/2020];100(5):1073-8. Available from: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.18-0955>
39. Oriol López FB. Tratamiento de la leptospirosis humana. Alternativa antibiótica. *Arch Med* [Internet]. 2015 [access: 18/08/2020];11(2). Available from: <https://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/tratamiento-de-la-leptospirosis-humana-alternativa-antibitica.php?aid=5841>
40. Murray CK, Hospenthal DR. Determination of susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. serovars to 24 antimicrobial agents by a broth microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 Oct [access: 04/04/2018];48(10):4002-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388465>
41. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2001 Nov [access: 04/04/2018];7(11):597-608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737084>
42. Correia L, Loureiro AP, Lilenbaum W. Reduced susceptibility in leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. *Epidemiology & Infection.* 2019;147.

43. OMS | Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. WHO [Internet]. 2015 [access: 18/08/2020]; Available from: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
44. Prabhu N, Meera J, Alwin RA, Natarajaseenivasan K, Uma AI. In vitro anti leptospiral activity of chloroform extract of Piper betle L. World J Pharm Sci 2014; 2(8):711-15.
45. Department of Health and Human Services. CDC's Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 (2019 AR Threats Report) includes the latest national death and infection estimates that underscore the continued threat of antibiotic resistance in the U.S. [Internet]. 2019 [access: 19/08/2020]. 150 p. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
46. Shivamallu C, Sharanaiah U, Kollur SP, Mallesh NKR, Hosakere RD, Balamurugan V. Pseudo-peptides as novel antileptospiral agents: Synthesis and spectral characterization. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc [Internet]. 2014 Jan 24 [access: 04/04/2018];118:1152-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184586>
47. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. J Food Drug Anal [Internet]. 2017 Apr 1 [access: 18/08/2020];25(2):403-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28911683/>
48. Mustafa H, Nabilah I, Wan Nor Amilah WAW. Anti-microbial activity of aqueous Quercus infectoria gall extract against pathogenic Leptospira. Malaysian J Med Sci [Internet]. 2018 Aug 1 [access: 21/08/2020];25(4):42-50. Available from: </pmc/articles/PMC6422538/?report=abstract>
49. Zubair MF, Atolani O, Ibrahim SO, Adebisi OO, Hamid AA, Sowunmi RA. Chemical constituents and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* (Schum & Thonn). Bayero J Pure Appl Sci [Internet]. 2017 Sep 28 [access: 21/08/2020];10(1):238. Available from: <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.35>
50. Andreia C, Cornelia M, Cristina T, Oana C, Ana-Flavia B, Bianca I, et al. Phenolic and sterolic profile of a phyllanthus amarus extract and characterization of newly synthesized silver nanoparticles. Farmacia [Internet]. 2018 [access: 21/08/2020];66:5. Available from: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.5.13>
51. Meksepralard C, Seesom W, Sondonprai S, Kitrapiumpon N, Jarintanan F, Tanechpongamb W. Screening of medicinal plants for their antileptospiral activity and synergistic response with ampicillin. Rev Clin Pharmacol Drug Therapy [Internet]. 2017 [access: 20/08/2020];15(Supl 1). Available from:

<https://cyberleninka.ru/article/n/screening-of-medicinal-plants-for-their-antileptospiral-activity-and-synergistic-response-with-ampicillin>

52. Ismail SR, Ismail S, Deris ZZ, Ismail N. In Vitro Antileptospiral Activity of Trigona thoracia Propolis and its Synergistic Effects with Commonly Prescribed Antibiotics [Internet]. Vol. 19, IIUM Medical Journal Malaysia. 2020 Apr [access: 21/08/2020]. Available from: <https://journals.iium.edu.my/kom/index.php/imjm/article/view/1317>

53. Rangel HA, Martínez FL, Sánchez MI, Pérez PI. Aceites esenciales como antioxidantes y antimicrobianos naturales. 2015. [access: 19/08/2020]; Available: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:4WMhrhUqgTcJ:scholar.google.com/+Aceites+esenciales+como+antioxidantes+y+antimicrobianos+naturales.&hl=es&as_sdt=0,5&as_ylo=2015&as_vis=1

54. Shin B, Park W. Zoonotic diseases and phytochemical medicines for microbial infections in veterinary science: current state and future perspective. *Frontiers in veterinary science*. 2018 Jul 24;5:166.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con el trabajo presentado.

Contribuciones de los autores

Patricia Hernández-Rodríguez: Concepción, diseño, obtención, análisis e interpretación de la información; así como en la elaboración, revisión y aprobación final del manuscrito.

Ludy Cristina Pabón: Concepción, diseño, obtención, análisis e interpretación de la información; así como en la elaboración, revisión y aprobación final del manuscrito.

Martha Fabiola Rodríguez: Concepción, diseño, obtención, análisis e interpretación de la información; así como en la elaboración, revisión y aprobación final del manuscrito.