

REPORTE FINAL DE ESTUDIO (RF)

1. Título

Determinación del tiempo de permanencia en sangre de una solución inyectable de Enrofloxacin en vehículo de larga acción (Enroflox 20 L.A.) luego de una sola aplicación intramuscular en bovinos de engorde.

2. Número de Ensayo

NN-2007

3. Tipo de Estudio

Ensayo de Laboratorio

4. Objetivo General

Evaluar el tiempo de permanencia en sangre de una solución inyectable de Enrofloxacin en vehículo de larga acción (Enroflox 20 L.A.) luego de una sola aplicación intramuscular en bovinos de engorde.

5. Investigador Principal

Olga Li Elias, Magister Química Farmacéutica del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

6. Sponsor

Agrovet Market S.A.

6.1. Equipo de trabajo

José Tang Ploog, Médico Veterinario Sub-Gerente de Investigación y Desarrollo de Agrovet Market S.A.

7. Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el distrito de Lurín, al sur de Lima entre el km 26 y el km 42 de la carretera Panamericana Sur. Se encuentra situado desde los 0 msnm hasta los 380 msnm Posee un clima no muy húmedo con 28 °c en promedio a pesar de ser un distrito litoral.

8. Antecedentes y Justificación

La enrofloxacin es una quinolona de tercera generación, es un agente antibacteriano arilfluoroquinolónico similar a la ciprofloxacina, que actúa al nivel del núcleo celular inhibiendo la síntesis del DNA (ácido desoxirribonucleico) de las bacterias. Tiene un espectro muy amplio de actividad antimicrobiana, siendo bactericida contra muchos patógenos Gram negativos, gran cantidad de bacterias Gram positivas y Micoplasmas (Booth, 1992. Sumano, 1997).

La enrofloxacin inhibe al nivel del núcleo celular la síntesis del DNA (ácido desoxirribonucleico) de las bacterias. El DNA tiene una longitud de más de mil micras y está contenido dentro de la bacteria, que generalmente mide entre una a dos micras, lo que indica que el DNA se encuentra condensado fuertemente en un espacio muy pequeño dentro del cromosoma celular. Durante la fase de

multiplicación de las bacterias, el DNA se pliega y despliega en forma alternada. Este proceso es esencialmente controlado por la enzima DNA girasa y la enrofloxacin inhibe este sistema enzimático provocando con ello un colapso en el metabolismo bacteriano evitando que la información vital puede ser copiada del DNA bacteriano. La enrofloxacin tiene por lo tanto efecto bactericida (Booth, 1992. García, 2001. Sumano, 1997).

Las fluorquinolonas en general tienen completa absorción parenteral; semivida de eliminación relativamente larga; gran volumen de distribución (2 a 4 litros/kg y aún más) y excelente penetración tisular (incluyendo fagocitos); eliminándose fundamentalmente por excreción renal y metabolismo hepático. Scheer encontró que la enrofloxacin es fácil y rápidamente absorbida luego de la administración parenteral en terneros, cerdos, perros, gatos, pollos y pavos, alcanzándose concentraciones máximas dentro de las 0.5 a 2 horas. En un ensayo la biodisponibilidad fue del 82% luego de la administración intramuscular, y del 100% luego de la subcutánea (Sumano, 1997).

En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de las fluorquinolonas es grande, siendo mucho mayor que el alcanzado por los betalactámicos y aminoglucósidos. Se alcanzan altas concentraciones en saliva y secreción nasal; en mucosa, epitelio y secreción bronquial, así como en el hígado y en el tracto urinario. Penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares, resultando en concentraciones mayores a las séricas. Varias quinolonas (incluyendo a la enrofloxacin) llegan con rapidez a la glándula mamaria (García, 2001).

Las fluorquinolonas son eliminadas del organismo principalmente por metabolismo hepático y excreción renal. Por lo general son parcialmente metabolizadas en el hígado, y excretadas en bilis y orina a altas concentraciones de droga activa (droga inalterada o metabolito activo). Las rutas metabólicas comunes de estos agentes son la dealquilación, glucoronización, oxidación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperazínico. En animales la excreción renal es variable, aunque ocurre filtración glomerular para la fracción no ligada, y también secreción tubular activa. La filtración glomerular y la secreción tubular permiten alcanzar altas concentraciones urinarias. El porcentaje de eliminación a través de la bilis varía entre las especies. La eliminación transepitelial a través de la pared gastrointestinal genera altas concentraciones en sitios de colonización de bacterias patógenas, e indudablemente contribuye a la alta eficacia de estos antimicrobianos en las enteritis bacterianas (García, 2001).

La enrofloxacin está indicada para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram positivas, Gram negativas y Micoplasmas tales como la Colibacilosis, Salmonelosis, Neumonía, Bronconeumonía (ERB), Diarreas, Mastitis, Pasteurelisis, Dermatitis y Micoplasmosis en bovinos, ovinos, porcinos, camélidos sudamericanos, caprinos, caninos, felinos, aves y conejos. En bovinos está aprobada para el tratamiento de ERB asociada con *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* y *Haemophilus sommus*. La dosis recomendada es de 2.5 a 5 mg/kg de peso vivo, vía intramuscular (Booth, 1992. Sumano, 1997).

La determinación de la actividad bactericida del suero es uno de los pocos métodos de sensibilidad "*in vitro*" que valora las interrelaciones existentes entre el antimicrobiano, el microorganismo y el paciente. Permite estudiar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano en presencia de suero y frente al microorganismo responsable del proceso. Para su determinación puede emplearse una técnica de macrodilución o de microdilución (García, 2001).

9. Fecha de Estudio y duración

El estudio se llevó a cabo en el año 2007, y tuvo una duración de 11 días.

10. Materiales y Métodos

10.1. Diseño experimental

El presente estudio se realizó con un diseño no controlado siendo la unidad experimental un animal. Posterior a la selección de los animales, se procedió a tomar una muestra de sangre para análisis del título del antibiótico respectivo. Estas muestras fueron clasificadas como muestras pre tratamiento (Pre-Tto).

Luego se procedió a inyectar el antibiótico en cuestión (Enroflox 20 L.A.®) en una sola inyección intramuscular en la dosis recomendada por el fabricante del producto, que es de 1 mL por cada 40 kg de peso vivo (5 mg/ kg de p.v.). Las muestras de sangre se obtuvieron de la siguiente manera (Tabla N°2):

La primera muestra antes de la aplicación del producto en prueba.

La segunda muestra a las 02 horas exactas post-aplicación del producto

La tercera muestra después de 24 horas y luego cada 24 horas por 04 días, de las cuales, se recolectó el suero en un lapso de tres horas de tomada la muestra y se conservó congelado a -20°C hasta el día de la prueba.

De las muestras obtenidas se recolectó el suero en un lapso de tres horas de tomada la muestra y se conservó congelado a -20°C hasta el día de la prueba de microdilución.

10.2. Tamaño de muestra

Se trabajó con 20 animales.

10.3. Selección de animales e identificación

Se trabajó con 20 bovinos de engorde, estabulados, de entre 200 y 450 kg de peso vivo.

10.4. Manejo de los animales experimentales

Los animales fueron alimentados en base a forraje y alimento concentrado, recibiendo dos raciones al día. Se les brindó agua ad libitum.

10.5. Disposición final de animales

Luego del tratamiento, los animales siguieron su ciclo productivo normal.

10.6. Tratamiento

Formulación comercial en base a Enrofloxacin (20 g) en 100 ml (Enroflox 20 L.A.®). El tratamiento constó de una sola inyección intramuscular en la dosis recomendada por el fabricante del producto, de 1 mL por cada 40 kg de peso vivo (5 mg/kg de p.v.)

10.7. Procedimientos de estudio

Las muestras de sangre fueron trabajadas con la técnica de microdilución, la cual se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Griffin en 1992, y por el NCCLS en 1998; empleando placas de microtitulación. Se hicieron diluciones progresivas de suero de tal forma que quedaron por pocillo 100 µl a los que se añadió el inóculo.

Preparada una serie de pocillos con 100 µL de caldo Mueller-Hinton, se añadió 100 µL de suero al pocillo 1, se mezcló; luego se pasó 100 µL al pocillo 2 y luego de éste al pocillo 3, se mezcló y se repitió la operación con los siguientes pocillos (se usaron un total de 4) y se desecharon los 100 µL tomados del último pocillo. De esta forma se lograron las diluciones de 1:2, 1:4, 1:8: 1:16 que son equivalentes aproximados a 30, 15, 7.5, 3.75 µg/mL de plasma respectivamente.

Se prepararon pocillos adicionales con 100 µL de caldo Mueller-Hinton para que sirvan de control de crecimiento y de esterilidad.

Se añadió 10 µL del inóculo al fondo de cada uno de los pocillos, salvo al de control de esterilidad. El inóculo fue una suspensión del *Staphylococcus aureus* aislado de bovinos y de probada sensibilidad a la enrofloxacin, ajustado al 0,5 de la escala de MacFarland. La incubación se realizó por 24 horas a 35°C. Las microplacas se cubrieron para evitar la evaporación.

Tras la incubación se determinó el poder inhibitorio o bacteriostático del suero, definido como la máxima dilución capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y aquella en la que desaparece la turbidez del crecimiento bacteriano.

El poder bactericida se define como aquella dilución que es capaz de destruir el 99.9% del inóculo inicial. Aunque no existe consenso en la interpretación de los resultados, títulos en el pico (muestras tomadas a los 60 minutos post inyección intramuscular) $\geq 1:32$ y en el valle (muestras tomadas inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis: en este caso las 5 muestras tomadas post aplicación del producto) $\geq 1:8$ (equivalente a 7.5 µg/mL de plasma) indican un poder bactericida adecuado. Por el contrario títulos $\leq 1:2$ en ambas tomas sugieren un poder bactericida inadecuado. (García, 2001. NCCLS, 1998)

Se evaluó hasta que día se conseguía una dilución con efecto bactericida.

10.8. Métodos estadísticos

Se utilizó estadística descriptiva para presentar los datos obtenidos.

11. Resultados

Los resultados se presentan en el siguiente cuadro:

**Tabla N° 1.-
Diluciones de los sueros que alcanzaron efecto bactericida
(Dilución \geq 1:8), por cada bovino y en cada muestreo.**

TITULO ALCANZADO POR MUESTREO						
N° Arete	Pre tratamiento	02 hrs Post tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
409	No inhibe	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2
401	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
402	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
407	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
408	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8
403	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
404	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
405	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
406	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
410	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8
414	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
418	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:2
413	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
411	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8
415	No Inhibe	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2
420	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:4
419	No Inhibe	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2
417	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8
412	No Inhibe	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2
416	No Inhibe	1:16	1:16	1:16	1:8	1:2

De acuerdo con lo establecido previamente, se observa en el Cuadro 1, los días que **Enroflox 20 L.A.** alcanzó efecto bactericida; es decir, hasta la dilución de suero \geq 1:8, en cada uno de los animales muestreados. Se comprobó que 04 bovinos (20%) alcanzaron hasta el día 04, la dilución igual a 1:8 y 20 bovinos (100%) alcanzaron hasta el día 03, diluciones \geq 1:8.

12. Conclusiones

El estudio demostró que el tratamiento con una sola aplicación intramuscular de **Enroflox 20 L.A.**[®], es capaz de mantener una concentración con efecto bactericida hasta el día 3 post tratamiento en el 100% de animales.



13. Autores del RF

José Tang Ploog, Médico Veterinario Sub-Gerente de Investigación y Desarrollo de Agroveter Market S.A.

Olga Li Elias, Magister Química Farmacéutica del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

14. Referencias Bibliográficas

- Booth N, McDonald L.** 1992. Farmacología y terapéutica veterinaria. Vol I. Ed. Acribia, Zaragoza. 619 p.
- García J A. y col.** 2001. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Disponible en:
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap12.htm#B22>
- Griffin J.** 1992. FERUM inhibitory and bactericidal titers. En: Isenberg HD Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington, Pp. 5.17.1-5.17.19.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1998. Methodology for the serum bactericidal test. Document M21-A. NCCLS, Wayne PA.
- Scheer M.** 1990. Enrofloxacin (Baytril) microbiological profile and pharmacokinetics in several species of animal. In: F. Simon, P Lees and G. Semjén (eds). *Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy in Food Producing Animals*, (University of Veterinary Science, Unipharma Co. Ltd., Budapest), 15-20
- Sumano H, Ocampo L.** 1997. Farmacología Veterinaria. 2da edición. México: McGraw-Hill Interamericana. pp: 519-537.

13. Anexos

Tabla N°2

Resumen del método de aplicación de Enroflox 20 L.A. y muestreos realizados

Nº Arete	Primer muestreo (pre – aplicación)	Peso (Kg)	Dosis (mL)	Segundo muestreo (2 hrs después)	Tercer muestreo (22/05)	Cuarto muestreo (23/05)	Quinto muestreo (24/05)	Sexto muestreo (25/05)
409	12.10 pm	250	6.5	14.15 pm	12.00 pm	12.10 pm	12.05 pm	12.00 pm
401	12.20 pm	450	11.5	14.25 pm	12.05 pm	12.15 pm	12.15 pm	12.10 pm
402	12.25 pm	400	10	14.28 pm	12.10 pm	12.20 pm	12.20 pm	12.20 pm
407	12.40 pm	200	5	14.40 pm	12.12 pm	12.25 pm	12.22 pm	12.22 pm
408	12.45 pm	250	6.5	14.47 pm	12.20 pm	12.30 pm	12.25 pm	12.30 pm
403	12.50 pm	350	9	14.52 pm	12.26 pm	12.35 pm	12.30 pm	12.35 pm
404	12.50 pm	300	7.5	14.57 pm	12.30 pm	12.40 pm	12.35 pm	12.40 pm
405	12.55 pm	250	6.5	14.59 pm	12.35 pm	12.45 pm	12.45 pm	12.45 pm
406	12.57 pm	250	6.5	15.00 pm	12.40 pm	12.50 pm	12.50 pm	12.50 pm
410	12.59 pm	250	6.5	15.05 pm	12.50 pm	12.56 pm	12.55 pm	12.55 pm
414	13.00 pm	200	5	15.07 pm	12.55 pm	12.58 pm	12.58 pm	13.00 pm
418	13.05 pm	400	10	15.09 pm	13.02 pm	13.05 pm	13.05 pm	13.10 pm
413	13.08 pm	350	9	15.10 pm	13.05 pm	13.15 pm	13.15 pm	13.15 pm
411	13.10 pm	350	9	15.15 pm	13.07 pm	13.17 pm	13.20 pm	13.20 pm
415	13.15 pm	200	5	15.20 pm	13.09 pm	13.19 pm	13.25 pm	13.25 pm
420	13.22 pm	450	11.5	15.27 pm	13.13 pm	13.25 pm	13.35 pm	13.30 pm
419	13.25 pm	450	11.5	15.30 pm	13.15 pm	13.30 pm	13.40 pm	13.35 pm
417	13.30 pm	250	6.5	15.35 pm	13.18 pm	13.35 pm	13.45 pm	13.45 pm
412	13.33 pm	200	5	15.45 pm	13.20 pm	13.40 pm	13.50 pm	13.50 pm
416	13.35 pm	250	6.5	15.55 pm	13.25 pm	13.45 pm	13.55 pm	13.55 pm

FOTOS ANEXAS



Foto N°1



Foto N°2

Aplicación intramuscular de Enroflox 20 L.A. en bovinos de engorde

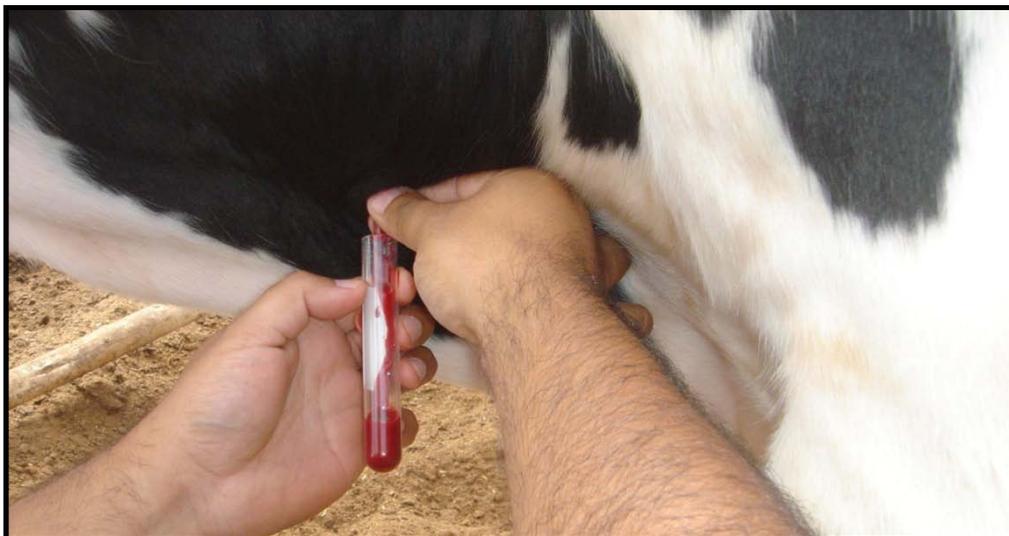


Foto N°3. Toma de muestra de sangre para determinación del tiempo de efectividad