

REPORTE FINAL DE ESTUDIO (RF)

1. Título

Evaluación de la Efectividad bacteriostática de una Solución Inyectable sobre la base de Oxitetraciclina dihidrato al 30% (Duramycin® 300 L.A.) y su permanencia en plasma en vacunos.

2. Número de Ensayo

990-05

3. Tipo de Estudio

Trabajo de Investigación

4. Objetivo General

El presente estudio fue realizado para determinar el tiempo (en días) que alcanza el antibiótico Duramycin® 300 L.A. (Oxitetraciclina de larga acción) manteniendo su efectividad, mediante la evaluación de la concentración antibiótica en el suero con actividad bacteriostática luego de una sola aplicación intramuscular.

5. Investigador(es)

5.1. 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.

5.2. Investigador(es) Colaborador(es)

Arnaldo Alvarado, Médico Veterinario Área de Microbiología Clínica y Pruebas Especiales de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

6. Sponsor

Agrovet Market S.A.

Dirección: Av. Canadá 3792-3798 San Luis, Lima 30, Perú.

Teléfono: (51) (1) 435 2323

6.1. Equipo de Trabajo

Jose Tang Ploog – Sub Gerente de Investigación y Desarrollo.

7. Lugar de Estudio

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

8. Antecedentes y Justificación

Las tetraciclinas, son antibióticos obtenidos a partir de varias especies de Streptomyces (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) o bien por semisíntesis (demeclociclina, metaciclina, doxiciclina y minociclina). Todos los antibióticos del grupo comparten una serie de características comunes (estructura química,

espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y toxicidad). Las principales diferencias radican en su perfil farmacocinético, lo que permite agrupar a las tetraciclinas en tres categorías: 1º las de vida media corta (6-8 h), como clortetraciclina, oxitetraciclina, y tetraciclina; 2º las de vida media intermedia (12-14 h), como demeclociclina y metaciclina; y 3º las de vida media larga (16-18 h), como doxiciclina y minociclina, que son las más liposolubles.

Pero con el uso de agentes como la Polividona k17, N-metil pirrolidona y la dimetil-acetamida como coadyuvantes en la formulaciones se logra menor irritación en el sitio de inyección y además son los causantes de una acción prolongada. Gracias a estas fórmulas retardantes, mediante una única inyección se puede realizarse una antibióticoterapia completa, ya que se logran concentraciones sanguíneas eficaces durante más de siete días.

La oxitetraciclina, es un antibiótico bacteriostático que actúa sobre los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis proteica. Su espectro de acción es muy amplio, abarcando gérmenes Gram positivo, Gram negativos, actinomiceto, protozoos, espiroquetas, rickettsias, micoplasmas y clamidias, en infecciones y enfermedades como: leptospirosis, pododermatitis, cistitis, queratoconjuntivitis, enteritis bacterianas.

La determinación de la actividad bactericida y bacteriostática en el 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 o bacteriostática 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.

Aunque no existen estudios controlados, la impresión clínica sería que para que un tratamiento con antibiótico sea efectivo, el suero del paciente en el momento del pico de actividad debe ser bactericida para el microorganismo infectante y esto es, a una dilución de no menor 1:8 (García Rodríguez y col., 2001).

9. Fecha de Estudio y duración

El estudio tuvo una duración aproximada de un mes, iniciándose en el mes de Octubre y terminando en Noviembre del 2005.

10. Materiales y Métodos

10.1. Diseño experimental

Se aplicó el PVI a los animales, para luego tomar muestras de sangre desde el día de aplicación, hasta el día 7 post-aplicación para luego poder determinar, mediante microdilución, el tiempo en que tiene una acción efectiva.

10.2. Tamaño de muestra

Se trabajó con un total de 20 bovinos.

- 10.3. Selección de animales e identificación
Se trabajaron con bovinos de engorde estabulados de entre 100 a 200 kg de peso vivo.
- 10.4. Manejo de los animales experimentales
Los animales fueron alimentados con una dieta especialmente formulada para sus necesidades y se les ofreció agua ad libitum.
- 10.5. Disposición final de animales
Luego del estudio, los animales siguieron su curso productivo normal.
- 10.6. Tratamiento
El PVI se trata de una solución comercial a base de Oxitetraciclina dihidrato al 30% (Duramycin® 300 L.A.)
- 10.7. Procedimientos de estudio
La técnica de microdilución se desarrollo de acuerdo a lo descrito por Griffin 1992, y por el NCCLS, 1998; que siguen las siguientes pautas: Lo fundamental es el empleo de placas de microtitulación y la necesidad de hacerlo por duplicado. Se hacen diluciones progresivas de suero de tal forma que queden por pocillo 100 µl a los que se añade el inóculo.

Preparado una serie de posillos con 100 uL de caldo Mueller-Hinton, se añade 100 uL de suero al posillo 1, mezclar; luego pasar 100 uL al posillo 2 y luego de este al posillo 3, mezclar y repetir la operación con los siguientes posillos (se usaron un total de 4) y desechar los 100 uL tomado del último posillo. De esta forma se logran las diluciones de 1:2, 1:4, 1:8: 1:16

Se preparan posillos adicionales con 100 uL de caldo Mueller-Hinton que sirva de control de crecimiento y de esterilidad.

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

Tras la incubación se determinó el poder inhibitorio o bacteriostático de las muestras de suero, que es definido como la máxima dilución capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y será aquella en la que no aparece la turbidez del crecimiento bacteriano.

Aunque no existe consenso en la interpretación de los resultados, títulos en el valle $1:8$ indican un poder bacteriostático adecuado. Por el contrario títulos ≤ 2 en las tomas sugieren un poder bacteriostático inadecuado (García y col, 2001).

10.8. Métodos estadísticos

Se usó la estadística descriptiva para la presentación de los datos obtenidos.

11. Resultados

Los resultados se presentan en los siguientes cuadros:

Cuadro 1 .- Diluciones de los sueros que alcanzaron efecto bacteriostático (Dilución \geq 1:8), por cada bovino y por día de muestreo.

Nº de Animal	DILUCION ALCANZADA CON INHIBICION DE CRECIMIENTO						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
01	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4	1:2
02	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8
03	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8
04	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4
05	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8
638	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8
641	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8
643	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
650	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:2
651	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8
636	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4	1:2
639	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2	1:2	1:2
640	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8	1:4	1:4
642	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4
644	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2	1:2	1:2
645	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:4	1:4
646	1:16	1:16	1:8	1:4	1:2	1:2	1:2
647	1:16	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8	1:4
648	1:16	1:16	1:8	1:4	1:4	1:2	1:2
649	1:16	1:16	1:8	1:8	1:2	1:2	1:2

De acuerdo con lo establecido previamente, se verifica en el Cuadro 1, los días que alcanzaron efecto bacteriostático; es decir, hasta la dilución de suero \geq 1:8, cada uno de los animales muestreados. Se comprobó que 07 bovinos (35%) alcanzaron hasta el día 7 una concentración inhibitoria requerida, 11 bovinos (55%) alcanzaron hasta el día 6, 15 bovinos (75%) alcanzaron al día 5, 18 bovinos (90%) alcanzaron hasta el día 4 y los 20 bovinos (100%) llegaron al día 3 con la concentración inhibitoria requerida.

12. Conclusiones

Se puede concluir que la aplicación de Duramycin® 300 L.A. en una sola dosis intramuscular de 30 mg / Kg de p.v. en bovinos, puede alcanzar niveles de concentración en sangre con efectividad inhibitoria de las bacterias sensibles, hasta por 07 días.

13. Autores del RF

José Tang Ploog

Médico Veterinario Sub-Gerente de Investigación y Desarrollo de Agrovet Market S.A.

14. Referencias Bibliográficas

García Rodríguez, José A. y col. 2001 Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap12.htm> obtenida el 20 May 2005 07:14:06 GMT

Griffin J. 1992. Serum 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 M 21-A.. NCCLS, Wayne PA.

15. Anexos



Foto 01: Terneros antes del ensayo



Foto 02: Aplicación de Duramycin® 300 L.A. vía intramuscular



Foto 03: Sangrado de la vena yugular para coleccionar suero sanguíneo



Foto 04: Materiales de laboratorio para la prueba

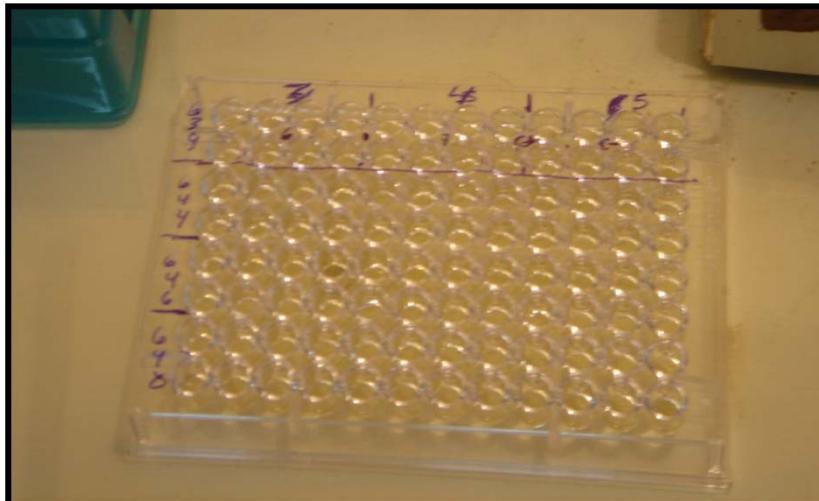


Foto 05: Placas de microtitulación con numeración de animales



Foto 06: Diluciones progresivas del suero sanguíneo