

REPORTE FINAL DE ESTUDIO (RF)

1. Título

Evaluación de la sinergia antimicrobiana de doxiciclina y florfenicol contra cepas ATCC de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Haemophilus sommus*.

2. Número de Ensayo

17-2011

3. Tipo de Estudio

Ensayo clínico de Laboratorio

4. Objetivo General

Determinar el tipo de actividad (sinergia, efecto aditivo, indiferencia o antagonismo) que evidencian la doxiciclina y florfenicol al usarse en conjunto frente a cepas de referencia de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Haemophilus somnus*, así como las concentraciones mínimas inhibitorias en la que ambos antibióticos presentan sinergia ante los patógenos evaluados.

5. Sponsor

Agrovet Market S.A.

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

Teléfono: (51) (1) 435 2323

5.1. Equipo de Trabajo

Roxana Angelats Mori – Jefe de Investigación y Diseño Experimental

Jose Tang Ploog – Sub Gerente de Investigación y Desarrollo.

Luis Alfredo Chávez Balarezo – Asistente de Investigación, Diseño e Innovación

Ana Gabriela Murguía Quintana – Jefe de Investigación en Sanidad animal

Gino Castillo – Supervisor en Sanidad animal

6. Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada en el distrito de San Borja, Lima.

7. Antecedentes y Justificación

La Doxiciclina y el Florfenicol son antibióticos de amplio espectro que actúan tanto sobre bacterias grampositivas como gramnegativas, así como en algunas especies de rickettsias y clamidias (Prescott, 2002). Ambos tienen acción bacteriostática, ya que actúan sobre receptores ribosomales bacterianos 50s para Florfenicol y 30s para Doxiciclina, bloqueando la comunicación entre ARNr y ARNt, inhibiendo así la síntesis proteica bacteriana (Plump, 2002) y por lo tanto el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos (Adams, 2003). Sin embargo, en recientes investigaciones se cree que la doxiciclina tendría un efecto además en la subunidad ribosomal 50s (Sumano, 1997; Plumb, 2002; Adams, 2003).

El florfenicol pertenece a la familia de los fenicoles, reconocidos por su amplio espectro de acción. El florfenicol contiene modificaciones mayores frente al ancestro de la familia de los fenicoles, el cloranfenicol: la primera, un cambio de un grupo nitro en grupo metil-sulfonil, que elimina el riesgo de aplasia medular que hizo prohibir el cloranfenicol (Adams, 2003). La segunda es un cambio de un grupo hidroxilo por un átomo de flúor, haciendo al florfenicol insensible a las cloranfenicol- acetil-transferasas, enzima productora del proceso de resistencia bacteriana al cloranfenicol (Prescott, 2002).

Dentro del espectro de acción del Florfenicol destaca su efecto sobre *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococos* y *Hemophilus* (Sumano, 1997). A su vez, se han realizado numerosos estudios en bovinos donde se ha demostrado la efectividad del Florfenicol en el tratamiento del Síndrome Respiratorio Bovino (*Pasteurella hemolítica*, *Mannheimia multocida* o *Haemophilus somnus*) (Adams, 2003).

Por su parte, la Doxiciclina es un derivado sintético de las tetraciclinas, que actúa sobre bacterias, mycoplasmas, clamidias y algunos protozoarios (Prescott, 2002). Es la más liposoluble de las tetraciclinas por lo que logra una amplia distribución en el organismo, contando con un mayor índice de biodisponibilidad (Sumano, 1997). Las bacterias más sensibles a la Doxiciclina son los estreptococos, neumococos, gonococos, clostridios (Sumano., 1997), *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Erysipelothryx rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Actinobacillus spp.*, *Brucella spp.*, *Francicella tularensis*, *Haemophilus spp.*, *Pasteteurella multocida*, *Borrelia spp.*, *Leptospira spp.*, *Actinomyces spp.*, *Mycoplasma spp.* (Adams., 2003).

La actividad de la Doxiciclina frente a las bacterias gramnegativas es similar a la del Florfenicol. A su vez, se destaca que la Doxiciclina es efectiva contra patógenos respiratorios (Sumano, 1997).

En procesos respiratorios del ganado vacuno se observa, que tanto la doxiciclina como el florfenicol resultan efectivos contra los principales agentes etiológicos (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* y *mycoides*, *Manheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*), aunque cabe recalcar que se ha reportado mayor resistencia a las tetraciclinas (Constable *et al.*, 2008). Debido al surgimiento de cepas resistentes de los patógenos respiratorios en mención, es necesario buscar combinaciones antibióticas que evidencien un efecto sinérgico sin necesidad de aumentar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno.

Los efectos en la actividad combinada de dos antimicrobianos pueden ser los siguientes: Indiferencia, donde la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario; Adicción, donde la actividad de los dos antimicrobianos es aproximadamente la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados; Sinergismo, donde la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adicción de las actividades de los dos antimicrobianos separados; y Antagonismo, donde la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados (Picazo, 2000).

Al no existir estudios que demuestren la actividad combinada del florfenicol y la doxiciclina, es necesario realizar un ensayo de laboratorio que evidencie la posible sinergia de ambos antimicrobianos.

8. Fecha de Estudio y duración

El Estudio se llevo a cabo del 12 de Diciembre del 2011 hasta el 4 de Enero del 2012, con una duración total de 24 días.

9. Materiales y Métodos

9.1. Tratamiento

El PVI es una solución comercial entre los que figuran dos antibióticos, los cuales fueron los usados en el presente estudio y se refiere a Florfenicol y Doxiciclina (Respibiotic® 48 horas)

9.2. Procedimientos de estudio

Se realizó la técnica del tablero de ajedrez descrita por Picazo (2000), en la cual se utilizarán diferentes diluciones de los antimicrobianos (florfenicol y doxiciclina) en concentraciones superiores o inferiores a la CMI de cada uno de ellos frente a los microorganismos a estudiar. Para ello se realizarán los siguientes pasos:

1. Preparación de diluciones

- En el eje X de colocará las diluciones del antimicrobiano A (doxiciclina) en las siguientes concentraciones: 0; 0.06; 0.12; 0.25; 0.50; 1 y 2 veces la CMI.
- En el eje Y se colocará las mismas diluciones del antimicrobiano B (florfenicol) de forma que la primera casilla corresponda a 0 X CMI de los dos antimicrobianos.

2. Preparación del inóculo e inoculación

- Se recuperarán las cepas ATCC adquiridas.
- Se preparará un matraz con una concentración de 2×10^5 UFC/ml de cada una de las cepas a testar.
- Se inoculará 0.5ml del inóculo a cada una de las diferentes combinaciones, de manera que finalmente se obtendrá un inóculo de 1×10^5 UFC/ml.
- Se incubará a 35-37°C durante 16 a 20 horas.

3. Determinación de la actividad combinada

- Luego del período de incubación de procederá a realizar la lectura de los tubos, determinando la inhibición del crecimiento bacteriano por la ausencia de turbidez del caldo.
- Luego se procederá a determinar la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) de cada antibiótico. Este índice se calcula dividiendo la concentración del antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento de una fila o columna entre la CMI de ese antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Una vez obtenidas las CIF de cada antimicrobiano se obtendrá el CIF conjunto mediante la suma de ambos CIF. La fórmula se muestra a continuación:

$$\text{Indice CIF} = \frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b}$$

- c. Para la interpretación de los resultados se comparará con los siguientes índices de CIF establecidos:
- Si $CIF \leq 0,5$ hay sinergismo
 - Si $CIF > 0.5$ y ≤ 1 hay adicción
 - Si $CIF > 1$ y ≤ 4 se suele considerar indiferencia
 - Si $CIF > 4$ se considera antagonismo.

10. Resultados

Los resultados para la cepa patrón ATCC® 12945 *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* se aprecian en el siguiente cuadro:

Cuadro N°1: Efectividad de antibióticos contra cepa patrón ATCC® 12945 *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*

EJE Y	EJE X	ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)								
	CMI FINAL	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
ANTIMICROBIANO B (Florefenicol S2)	0									
	0.125									
	0.25									
	0.5									
	1									
	2									
	4									
	8									
	16									

El recuadro aparece sombreado en gris cuando el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

La CMI de Doxiciclina se determinó en 2 y la CMI de Florfenicol en 4. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CIF)_a} + \frac{(B)}{(CIF)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

$$CIF = \frac{2}{4} + \frac{4}{2} = 0.5 + 2 = 2.5 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$

Los resultados para la cepa patrón ATCC® 700025 *Haemophilus somnus* se aprecian en el siguiente cuadro:

Cuadro N°1: Efectividad de antibióticos contra cepa patrón ATCC® 700025 *Haemophilus somnus*

EJE Y	EJEX CMI FINAL	ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)							
		0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
ANTIMICROBIANO B (Florefenicol ≤ 2)	0								
	0.125								
	0.25								
	0.5								
	1								
	2								
	4								
	8								
	16								

El recuadro aparece sombreado en gris cuando el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

La CMI de Doxiciclina se determinó en 8 y la CMI de Florefenicol en 4. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CIF)_a} + \frac{(B)}{(CIF)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

$$CIF = \frac{8}{4} + \frac{4}{2} = 2 + 2 = 4 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$

Los resultados para la cepa patrón ATCC® 33396 *Manheimia haemolytica* se aprecian en el siguiente cuadro:

Cuadro N°1: Efectividad de antibióticos contra cepa patrón ATCC® 33396 *Manheimia haemolytica*

EJE Y	EJE X CMI FINAL	ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)							
		0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
ANTIMICROBIANO B (Florefenicol ≤ 2)	0								
	0.125								
	0.25								
	0.5								
	1								
	2								
	4								
	8								
16									

El recuadro aparece sombreado en gris cuando el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

La CMI de Doxiciclina se determinó en a y la CMI de Florfenicol en 2. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CIF)_a} + \frac{(B)}{(CIF)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

$$CIF = \frac{1}{4} + \frac{2}{2} = 0.25 + 1 = 1.25 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$

11. Conclusiones

El presente estudio no encontró alguna relación de Sinergia ni antagonismo en el efecto del Florfenicol y la Doxiciclina combinados. La presencia de ambos antibióticos en una misma fórmula comercial se puede justificar en la posibilidad de cubrir el espectro de bacterias en caso exista resistencia a alguno de los dos antibióticos.

12. Autores del RF

José Tang Ploog

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

13. Análisis de Laboratorio

Laboratorio de Bacteriología y Micología

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

14. Referencias Bibliográficas

Adams R. 2003. Farmacología y terapéutica veterinaria. 2da edición. España: Acribia. 1277p.

Constable P, Pyorala S, Smith G. 2008. Guidelines for antimicrobial use in cattle. en: Guardabassi L, Jensen L, Kruse H. Guide to antimicrobial use in animals. Dinamarca: Blackwell Publishing. pp: 143-157.

Picazo J. 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micología Clínica. Cap. 12. Métodos Especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. [Internet] [09 Noviembre 2011] Disponible: http://www.educa.madrid.org/cms_tools/files/8fe96293-faab-4630-b14b-89ee5825509a/Microbiologia/Métodos_especiales_antimicrobianos.pdf

Prescott JF, Baggott JD, Walker RD. 2002. Terapéutica microbiana en medicina veterinaria. 3ra edición. Argentina: Intermedica. 687p.

Plump D. 2002. Veterinary drug handbook. 4ta edición. USA: Pharmavet publishing. 993p.

Sumano H, Ocampo L. 1997. Farmacología veterinaria. 2da edición. Mexico: McGraw-Hill interamericana. 680p.

15. Anexos

Anexo N°1: Resultados de laboratorio



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 (Universidad del Perú, Decana de América)
 FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
 SECCION DE BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA
 Av. Circunvalación cuadra 28 s/n – San Borja
 Teléfonos 435-3348 /435-3349 Anexo 210 – Fax 436-1027



SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA VETERINARIA

INFORME FINAL

I. DATOS PRELIMINARES

Nº EXPERIMENTO:	001UB/2012
REMITENTE	M.V. ROXANA ANGELATS MORI
PROCEDENCIA /EMPRESA	AGROVET MARKET Animal Health S.A.
TITULO DEL PROYECTO	"Evaluación de la sinergia antimicrobiana de Doxiciclina y Florfenicol contra cepas patrón de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Haemophilus somnus</i> "
ANÁLISIS SOLICITADO	PRUEBA DE SINERGIA
PRUEBA UTILIZADA	TECNICA DEL TABLERO DE AJEDREZ (Método de dilución en caldo – Concentración Mínima Inhibitoria CMI)*
MATERIAL PROPORCIONADO POR LA EMPRESA	<ul style="list-style-type: none"> - Doxiciclina Hiclato YK2010120101 (5 grs.) F. Fab: 01/12/2010 – F. Ven: 01/12/2012 - Florfenicol YK201042701 (5 grs.) F. Fab: 27/11/2010 – F. Ven: 27/11/2012 - ATCC®12945™ <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> (4 pasajes). F. Ven: 07/2012 - ATCC®700025™ <i>Haemophilus somnus</i> (4 pasajes). F. Ven: 03/2013 - ATCC®33396™ <i>Mannheimia haemolytica</i> (4 pasajes). F. Ven: 03/2013
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRUEBA	<ul style="list-style-type: none"> - Placas de agar Sangre - Placas de agar Chocolate - Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (CAMHB) - Caldo VFM (Veterinary fastidious medium)
EJECUTOR (ES)	Dra. Chris Pinto Jiménez /M.V. Geraldine Choquehuanca Miranda
FECHA DE RECEPCIÓN	12/12/2011
FECHA DE PROCESAMIENTO	21/12/2011

*Según protocolo 15UB/FMV adaptado de acuerdo a la norma M31-A2 (NCCLS 2002) y García et al., 2001.



II. PROCEDIMIENTOS

1. Se sembraron las cepas patrón de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Se disolvieron y se prepararon diluciones de los antibióticos de acuerdo al protocolo 15UB/FMV.
3. Se prepararon diluciones para cada antibiótico en las siguientes concentraciones: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1, 2 y 4 veces la CMI de cada uno. CMI de Doxiciclina ≤ 4 y la CMI de Florfenicol: ≤ 2 .
4. Se realizó la técnica siguiendo las instrucciones indicadas en el protocolo 15UB/FMV.
5. Se determinó la CIF de cada antibiótico para cada cepa patrón. Interpretación: Si CIF $\leq 0,5$ hay sinergismo; si CIF $>0,5$ y ≤ 1 hay adicción; si CIF > 1 y ≤ 4 el efecto es indiferente y si CIF > 4 se considera antagonismo.

III. RESULTADOS

ENSAYO 1: Cepa patrón probada: ATCC®12945™ *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*

EJE Y	EJE X	ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)							
	CMI Final	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
ANTIMICROBIANO B (Florfenicol ≤ 2)	0								
	0.125								
	0.25								
	0.5								
	1								
	2								
	4								
	8								

El recuadro aparece sombreado en gris cuando en el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

La CMI de Doxiciclina se determinó en 2 y la CMI de Florfenicol en 4. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

$$CIF = \frac{2}{4} + \frac{4}{2} = 0,5 + 2 = 2,5 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$



UNMSM - FMV UB001/2012
 LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA VETERINARIA SECCION DE
 BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA

ENSAYO 2: Cepa patrón probada: ATCC®700025™ *Haemophilus somnus*

EJE Y	EJE X		ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)							
	CMI Final		0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
ANTIMICROBIANO B (Florfenicol ≤ 2)	0									
	0.125									
	0.25									
	0.5									
	1									
	2									
	4									
	8									

El recuadro aparece sombreado en gris cuando en el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

La CMI de Doxiciclina se determinó en 8 y la CMI de Florfenicol en 4. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIF_a + CIF_b = ÍndiceCIF$$

$$CIF = \frac{8}{4} + \frac{4}{2} = 2 + 2 = 4 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$

ENSAYO 3: Cepa patrón probada: ATCC®33396™ *Mannheimia haemolytica*

EJE Y	EJE X		ANTIMICROBIANO A (Doxiciclina ≤ 4)							
	CMI Final		0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
ANTIMICROBIANO B (Florfenicol ≤ 2)	0									
	0.125									
	0.25									
	0.5									
	1									
	2									
	4									
	8									

El recuadro aparece sombreado en gris cuando en el tubo ensayado con la concentración antibiótica combinada (indicada en los ejes X/Y) se observó turbidez, es decir, hubo crecimiento bacteriano.

Entonces la CMI de Doxiciclina es 1 y la CMI de Florfenicol es 2. Aplicando la fórmula para determinar Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF):

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIF_a + CIF_b = ÍndiceCIF$$

$$CIF = \frac{1}{4} + \frac{2}{2} = 0,25 + 1 = 1,25 \rightarrow \text{Efecto Indiferente}$$



IV. CONCLUSIÓN:

La actividad conjunta de Doxiciclina y Florfenicol no difiere de la actividad del antibiótico más efectivo en solitario, cuando son enfrentados a las cepas patrón de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Haemophilus somnus*.


V. BIBLIOGRAFIA

García R., José A.; Cantón, Rafael; García S., J. Elias; Gómez-Lus, M^a Luisa; Martínez M., Luis; Rodríguez-Avial, Carmen y Vila, Jordi. 2001. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved Standard. 2nd ed. USA: NCCLS Document M31-A2. 82 p.



ma, 04 de Enero del 2012


DRA. SONIA CALLE ESPINOZA
RESPONSABLE DEL LABORATORIO