

Resultados del estudio del efecto interactivo entre amoxicilina y enrofloxacina para su uso en la terapia y prevención de enfermedades en medicina veterinaria

Resultados do estudo do efeito interativo entre a amoxicilina e a enrofloxacina para uso na terapia e prevenção de doenças em medicina veterinária

DOI: 10.34188/bjaerv5n2-065

Recebimento dos originais: 20/01/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

Victor Octavio Fuentes-Hernández

Medico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autonoma de México. Doctor en Farmacología (PhD), Universidad de Nottingham, School of Pharmacy, Inglaterra. Posdoctorado en Farmacologia Veterinaria, University of Edinburgh, Escocia, Reino Unido

Profesor investigador, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Avenida Rafael Casillas Aceves 1200, Tapatitlán Jalisco, Mexico 47600
E-mail: vfuentes@cualtos.udg.mx, victoroctaviof@yahoo.com

RESUMEN

Se realizó una prueba in vitro sobre la interacción farmacológica de la combinación antibiótica entre amoxicilina y enrofloxacina. Con este objetivo se utilizó un método de desafío in Vitro. Los resultados se utilizaron para calcular su interacción utilizando la representación gráfica conocida como ISOBOLOGRAMA. Se utilizaron las sales puras de amoxicilina y enrofloxacina las cuales fueron proporcionadas por el fabricante del producto. Se utilizó el método de bioensayo en pozas de agar. Para cuantificar los resultados se tomaron los siguientes criterios: Un efecto de sinergia se definió cuando el efecto real/teórico (FME) era mayor que 1. El efecto aditivo se definió cuando el FME era igual que 1. Y el efecto de antagonismo se definió cuando el efecto observado era menor que 1. El mejor efecto de uno de los antibióticos cuando se utilizaba por si solo. El área entre el antagonismo y el efecto aditivo se definió como la zona de indiferencia. Al estudiar la interacción entre florfenicol y tilosina tartrato se observó que la mejor FME de esta combinación antibiótica fue de 1.45 cuando la proporción de la concentración entre los antibióticos era de 1 : 4 (amoxicilina y enrofloxacina respectivamente). En consecuencia se puede postular que la combinación de florfenicol con tartrato de tilosina demostró un efecto sinérgico y puede ser recomendada en aves y porcinos para el tratamiento de las infecciones por micoplasmas la mayor parte de los germen gram + y gram- y otros agentes infecciosos sensibles a la formula.

Palabras clave: amoxicilina, enrofloxacina, isobolograma.

RESUMO

Foi realizado um teste in vitro sobre a interação farmacológica da combinação antibiótica entre amoxicilina e enrofloxacina. Um método de desafio in vitro foi utilizado para este fim. Os resultados foram utilizados para calcular sua interação utilizando a representação gráfica conhecida como ISOBOLOGRAM. Os sais puros de amoxicilina e enrofloxacina foram utilizados e fornecidos pelo fabricante do produto. O método do bioensaio de ágar foi utilizado. Os seguintes critérios foram usados para quantificar os resultados: Um efeito de sinergia foi definido quando o efeito real/teórico (SMF) foi maior que 1. O efeito aditivo foi definido quando o SMF foi igual a 1. E o efeito antagonista foi definido quando o efeito observado foi menor que 1. O melhor efeito de um dos

antibióticos quando usado por si só. A área entre o antagonismo e o efeito aditivo foi definida como a zona de indiferença. Ao estudar a interação entre florfenicol e tartarato de tilosina, observou-se que o melhor SMF desta combinação antibiótica era 1,45 quando a razão de concentração entre os antibióticos era 1 : 4 (amoxicilina e enrofloxacin, respectivamente). Consequentemente, pode ser postulado que a combinação de florfenicol com tartarato de tilosina mostrou um efeito sinérgico e pode ser recomendada em aves e suínos para o tratamento de infecções por micoplasma, a maioria das gram + e gram - germes e outros agentes infecciosos sensíveis à formulação.

Palavras-chave: amoxicilina, enrofloxacin, Isoblograma

1 INTRODUCCIÓN

Desde que Ehrlich padre de la quimioterapia inició el combate de las infecciones predicando una enfermedad una bala, y asimismo cuando se empezó a utilizar la sulfonamida y se posteriormente se descubrió la penicilina, los Médicos Veterinarios buscaron la manera de combinarlos para aumentar la efectividad contra las enfermedades producidas por gérmenes infecciosos susceptibles a cada uno los mismos.

La combinación de los dos fármacos antibacterianos amoxicilina y enrofloxacin es una combinación muy conocida de medicamentos veterinarios. En este fármaco se ha demostrado un efecto sinérgico in vitro entre las quinolonas y los β -lactámicos. Este fármaco está indicado para el tratamiento de infecciones bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas en el tracto digestivo, y en infecciones respiratorias, intestinales, urinarias y de la piel en ganado y perros (Batrawi et al. 2017, Nedbalcova et al. 2019)

En este caso en particular se hace necesario mencionar las propiedades farmacológicas y terapéuticas de la Amoxicilina y la Enrofloxacin.

AMOXICILINA. Es una aminopenicilina que también se le conoce como p-hidroxiampicilina o BRL 2333, esta es mejor como opción que la ampicilina su actividad es menor contra Shigella.

MECANISMO DE ACCION Produce desarreglo en la permeabilidad selectiva de las bacterias; así inhibe la regeneración de la membrana de la célula bacteriana, y por tanto la destruye. De hecho el peptidoglicano endurece y le da forma a la pared celular de las bacterias. El peptidoglicano es un mucopéptido estructurado con cadenas lineales de polisacáridos conjugados con uniones peptídicas. Este proceso consta por lo menos de treinta pasos enzimáticos y se divide en tres fases. En la primera, se forma y se acumula el precursor de la pared celular (UDP-acetilmuramyl-pentapéptido). En la segunda, dicho precursor primero se conjuga con un fosfolípido en la membrana; después, con UDP-N-acetilglucosamina durante la liberación de nucleótidos de uridina. Este conjugado se modifica de nuevo y da lugar a un polímero lineal de peptidoglicano. La tercera fase ocurre fuera de la membrana celular; ahí se produce, la unión cruzada de los

polímeros lineales de peptidoglicano con intervención de uniones peptídicas. Así se completa la formación de la envoltura externa de la célula bacteriana.

Se han identificado diversas proteínas conjugadoras de penicilina (PCP), las cuales se vinculan con las membranas celulares de bacterias grampositivas y gramnegativas. Acaso éstas PCP son enzimas relacionadas con la división, elongación y formación de tabiques y el mantenimiento de la forma celular (transpeptidasas, carboxipeptidasas). En consecuencia, cada especie bacteriana tiene un grupo característico de PCP; éstas difieren mucho entre grampositivas y gramnegativas. Las PCP se marcaron con secuencias numéricas como PCP1, PCP1a, PCP1b. La mayor parte de penicilinas y cefalosporinas se conjugan con PCP1, PCP3 o ambas, entonces producen lisis de la pared celular y formas filamentosas alargadas. En contraste, la amidinocilina se conjuga con PCP2 y produce células ovoides. Las PCP de gran importancia para las bacterias grampositivas son PCP1, PCP2 y PCP4. Cuando las penicilinas se unen a estas PCP inhibe la función del ácido lipotéico y de las transpeptidasas y carboxipeptidasas, lo que explica los hallazgos previos sobre el mecanismo de acción de las penicilinas.

La amoxicilina es más resistente al pH ácido del estómago que la penicilina y con una vida media biológica de 17 horas.. (Ruiz, 2000).

La amoxicilina se ha convertido en una de las principales sustancias antimicrobianas en la medicina porcina para el tratamiento y control de las infecciones sistémicas graves, como el *Streptococcus suis* (Burch & Sperling 2018)

Es útil en enfermedades de gatos, perros, pichones, caballos, gallinas, porcinos, cabras, ovejas, becerros prerumiantes y ganado en general.

En perros y gatos la amoxicilina se utiliza contra infecciones respiratorias, urinarias y en heridas de tejidos blandos infectadas por bacterias Gram+ y Gram-.

En aves se utiliza para el tratamiento de infecciones susceptibles del tracto gastro intestinal, urogenital y respiratorio. (APVMA, 2007).

En cerdos se utiliza sobre todo para atacar infecciones respiratorias con énfasis aquellas en las que interviene *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*. Asimismo para atacar a *E. coli* y estreptococos en el tracto urinario. <https://doi.org/10.1111/jvp.12482>

En porcinos se ha indicado el uso de la amoxicilina contra enfermedades producidas por bacterias dividiéndola en tres categorías principales:

- En infecciones sistémicas – infecciones septicémicas por bacterias que coloniza primariamente al tracto respiratoria y amígdalas- entre estas *Streptococcus suis*,

Haemophilus parasuis and *Actinobacillus suis*, incluyendo *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que pueden colonizar la piel del animal enfermo.

- Infecciones Respiratorias – *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* que pueden causar rhinitis, bronquitis y pneumonia-
- Infecciones entéricas - *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. Que pueden ser agentes causales de enteritis y diarreas durante las diferentes fases de la producción porcina. *Escherichia coli* también se asocia con MMA después del parto presentando un patrón de sensibilidad variable y menor Resistencia cuando se compara con los aislamientos entéricos..

En ovejas es útil en enfermedades respiratorias pulmonares provocadas por *Pasteurella* spp. Y *Haemophilus* spp.

En cabras útil contra infecciones del tracto respiratorio en las que intervienen bacterias tales como *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida*, *H. somnus*, pero no recomendable contra *S. aureus* productor de penicilinasas.

En becerros preruminantes es útil en enteritis bacterianas por *E. coli*, y en vacas es útil en las infecciones respiratorias, fiebre de embarque y pneumonías por *P. multocida*, *M. haemolytica* ssp, *estreptococos* spp, *Estafilococos* spp, asimismo útil en pododermatitis por *Fusarium necrophorum*. En vacas en lactación por vía intramamaria de amoxicilina trihidrato con 62.5 mg de amoxicilina en cada jeringa en cada cuarto infectado

Se recomienda para el tratamiento de la sobreproducción bacteriana intestinal del perro utilizando dosis totales de 20 mg/kg. dos veces al día.

Administrándola en la presentación pediátrica para humanos se usa la amoxicilina en gatos lactantes para prevenirlos contra infecciones del neonato por *estreptococos*. Administrándola cada 12 horas por 5 días. Cuando los gatitos se enferman al nacer, es muy difícil que sobrevivan, y se debe tomar una acción preventiva con los que sobreviven. Combinada con gentamicina produce un efecto sinérgico de consideración.

Absorción:

En perros y gatos amoxicilina + clavulanato se mantienen estables en pH estomacal después de su aplicación oral.

En becerros de 2 semanas de edad con clavulanato en dosis de 10 a 20 mg/kg se absorbe en un 34 a 35%.

En becerros de 6 semanas de edad la absorción oral es más difícil y es probable que no desarrollen concentraciones séricas apropiadas.

En caballos la administración oral de amoxicilina solo logra un 10% de absorción en animales adultos.

En perros la disponibilidad sistémica es de 60% 70%, su absorción es buena aún en presencia de alimento.

DOSIS

En especies de producción para el consumo humano, se utiliza la amoxicilina trihidrato por vía oral en suspensión para lechones menores de 4.5 kg dosis de 40 mg dos veces al día. En polvo soluble se recomiendan 400 mg/45.5 kg dos veces al día en rumiantes pre ruminales, y a sea en toma directa o mezclada en la leche. Bolos de 400 mg de amoxicilina para becerros preruminales de hasta 45.5 kg. En polvo esteril se usa en suspensión para dosificar a razón de 6.6 – 11 mg/kg una vez al día, para administración intramuscular o subcutánea en ganado bovino.

En ovejas se usa en suspensión esteril de 50 mg/mL en dosis de 7 mg/kg una vez al día, . En fórmula LA con 160 mg/mL para aplicación intramuscular en dosis de 15 mg/kg cada tercer día; y en suspensión de 200 mg/mL en dosis de 1 mL/20 kg para bovinos, ovejas y porcinos. DOSIS: BOVINOS 10 mg/kg. cada 24 horas intramuscular profunda, en infecciones respiratorias aplicar cada 12 horas.

CABALLOS: En infecciones respiratorias 20 a 30 mg/kg. oral cada 6 horas, o intramuscular usando la sal trihidrato 20 mg/k cada 12 horas.

AVES: Para la mayoría de las aves 150 a 175 mg/kg. oral una o dos veces al día. En vacas lecheras la amoxicilina trihidrato en suspensión al 20% se absorbe mejor aplicada en la tabla del cuello y hombro mas que cuando aplicada en los anóneos o subcutánea.

PERROS: 20 – 30 mg/kg/oral/8 – 12 horas

Uso de la amoxicilina mezclada en el alimento: Esta acción presenta dos ventajas:

Se pueden tratar grandes cantidades de porcinos con un minimo de mano de obra.

En tratamientos de varios días las posibilidades de que en algunos no se logre la medicación adecuada es poco probable.

Pero en ocasiones el tiempo de reacción puede tardar varios días para ejercer efecto, debido a que la infección se detecta y la medicación tiene que programarse para vaciar de inmediato los alimentadores y rellenarlos con la alimentación medicada, lo cual lleva tiempo. Asimismo la ingestión de alimento medicado puede ser menor en animales enfermos y la dosis necesaria no llega a consumirse. Es importante que el medico clínico vigile la posibilidad de disbiosis intestinal en los animales tratados con amoxicilina por vía oral, sobre todo en lechones.

MRLs

En ADi se estableció que es aceptable 42µg para una persona de 60 kg.

El metabolito de Amoxi es el ácido amoxiciloico y la dketopiperazina que no poseen actividad antibacteriana.

ENROFLOXACINA

Esta quinolona y su metabolito ciprofloxacina poseen una estructura muy similar y sus espectros son también parecidos. La enrofloxacin es bactericida (Ruiz, 2000).

MECANISMO DE ACCION: Actúan inhibiendo la DNA-girasa bacteriana, una topoisomerasa tipo II, lo que impide el enrollamiento del DNA y asimismo la síntesis de DNA. Pueden también parar la respiración y la división celular. También pueden interrumpir la integridad de la membrana celular.

ESPECTRO ANTIBACTERIANO: El espectro de la enrofloxacin y de la ciprofloxacina es similar poseen buena actividad en contra de muchos gérmenes gram negativos y también contra cocos. Se incluyen la mayoría de las especies y cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Enterobacter*, *camphilobacter*, *Shiguella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia* y *Vibrio*. Dentro de los gérmenes también sensibles se puede incluir a *Brucella*, *Clamidia tracomatis*, *Estafilococos* incluyendo a los resistentes a la Meticilina y los productores de penicilinas, *Mycoplasma* y *Mycobacterium* (o ataca al agente causal de la enfermedad de Jhone. La actividad de las fluoroquinolonas contra los *Estreptococos* es muy variable por lo que no se recomiendan contra estos gérmenes. Su acción es muy débil en contra de anaerobios por lo cual no es efectivo en las infecciones por anaerobios. Se puede presentar cierto grado de resistencia bacteriana sobre todo por *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* y enterococos, pero parece que la resistencia mediada por plásmidos no se hace presente.

FARMACOCINÉTICA: Cuando se administran por vía oral se absorben bien, produciendo niveles máximos en perros en una hora después de su administración oral. Se distribuyen muy bien por todo el organismo, obteniéndose las concentraciones más elevadas en la bilis, riñones, hígado, pulmones y en el sistema reproductor sobre todo en el líquido prostático y en los tejidos del sistema. También se logran niveles terapéuticos en el hueso, líquido sinovial, en la piel, en músculo, humor acuoso y en los líquidos pleurales. La concentración es baja en el líquido cerebro espinal.

Se eliminan por vías renales y no renales, del 15 al 50% se eliminan sin cambio en la orina, por filtración tubular y filtración glomerular. La enrofloxacin es metabolizada transformándola

en ciprofloxacina. Su eliminación es por vía renal y hepática, su vida media en perros es de aproximadamente 4 horas (Mckellar et al. 1999).

La farmacocinética de la ciprofloxacina se ha estudiado en becerras y cerdos, en becerras la biodisponibilidad es de 50% y en un marrano se observó que es de 40%, en ambas especies la vida media es de 2.5 horas.

La enrofloxacin es muy eficaz en el tratamiento de la inflamación respiratoria, urinaria, gastrointestinal y de la piel en perros y gatos

En perros con infecciones del tracto urinario tratados con enrofloxacin, hasta el 88,6% de los individuos se recuperaron, s pioderma, causada por *Staphylococcus intermedius*. Se ha demostrado que el uso de enrofloxacin a una dosis de 5 mg/kg durante un mínimo de una semana puede ser un tratamiento eficaz para esta enfermedad. La conjuntivitis en los gatos, causada por *Chlamydomphila felis*, también puede tratarse eficazmente con enrofloxacin. En el ganado vacuno, la enrofloxacin se ha utilizado para controlar las infecciones bacterianas de la mastitis, el tracto respiratorio y el gastrointestinal. la aplicación subcutánea de enrofloxacin (a 7,5 mg/kg) es eficaz contra *Mannheimia haemolytica*. administrada dos veces al día durante 5 días mediante infusiones intramamarias (infusiones en la ubre) a una dosis de 300 mg. El 65% de los bovinos tratados con enrofloxacin clorhidrato dihidrato se recuperaron, mientras que la introducción adicional de ceftiofur-HCl condujo a una recuperación del 100%.

También se ha confirmado el efecto de la enrofloxacin en enfermedades bacterianas de las aves de corral, como la salmonelosis, la colibacteriosis y la pastereiosis, administrada s en el agua de bebida a una dosis de 10 mg/kg durante 3 o 5 días. En pavos triplemente infectados con *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* y neumovirus aviar (APV) la enrofloxacin fue un bactericida más eficaz que el florfenicol (a 20 mg/kg por 5 días) o la amoxicilina (a 20 mg/kg por 5 días).

Efectos adversos

Con la excepción de las posibles anomalías del cartílago en animales jóvenes (véase Contraindicaciones más arriba), el perfil de efectos adversos de la enrofloxacin suele limitarse al malestar gastrointestinal (vómitos, anorexia). En perros, también se han notificado raras incidencias de elevación de las enzimas hepáticas, ataxia, convulsiones, depresión, letargo y nerviosismo. Pueden producirse reacciones de hipersensibilidad o cristaluria.

En gatos, se han notificado raras incidencias de toxicidad ocular caracterizadas por midriasis, degeneración de la retina y ceguera. Estos efectos se observaron generalmente en rangos de dosis más altos (>15 mg/kg) y han hecho necesaria una reducción de las recomendaciones de

dosís en gatos a un máxímo de 5 mg/kg/día. Otros efectos adversos poco frecuentes observados en gatos pueden incluir: vómitos, anorexia, elevación de las enzimas hepáticas, diarrea, ataxia, convulsiones, depresión/letargo, vocalización y agresividad.

Por lo general, no se recomienda el uso de fluoroquinolonas durante el embarazo, a menos que los beneficios del tratamiento superen claramente los riesgos.

DOSIS

Perros: Para infecciones susceptibles:

a) 5 - 20 mg/kg por día PO, puede administrarse una vez al día o dividirse y administrarse dos veces al día (q12h). El tratamiento debe continuar durante al menos 2 - 3 días después del cese de los signos clínicos, hasta una duración máxima de la terapia es de 30 días.

b) Para la sepsis: 5 - 20 mg/kg IV q12h

Para piodermas profundas, infecciones urinarias complicadas: 5 mg/kg PO una vez al día (q24h) durante 7 - 14 días (el tratamiento puede ser necesario durante 10 - 12 semanas para piodermas profundas, especialmente en pastores alemanes);

Para infecciones del tracto respiratorio inferior 5 - 10 mg/kg PO una vez al día (q24h) durante 7 - 84 días;

Para infecciones de la próstata: 5 mg/kg PO dos veces al día (q12h) durante 7 - 14 días;

Para la colitis ulcerosa histiocítica: 5 mg/kg PO dos veces al día (q12h) durante 21 - 90 días;

Para la micoplasmosis hemotrópica: 5 mg/kg PO, IM q12h durante 7 - 14 días;

Para infecciones ortopédicas sistémicas: 5 - 11 mg/kg PO, IV, IM, SC q12h durante 10 días;

Para infecciones por *Pseudomonas* en tejidos blandos: 11 - 20 mg/kg PO, IM, SC q12h durante 7 días como mínimo, tratar el tiempo que sea necesario;

Para bacteriemia, sepsis: 11 mg/kg PO, IV, IM, SC q12h durante el tiempo que sea necesario.

Gatos:

Para infecciones susceptibles:

a) 5 mg/kg al día PO, puede administrarse una vez al día o dividirse y administrarse dos veces al día (q12h). El tratamiento debe continuar durante al menos 2 - 3 días después del cese de los signos clínicos, hasta una duración máxima de la terapia es de 30 días

Caballos:

Nota: El uso de la enrofloxacin en caballos sigue siendo algo controvertido.

Aunque se ha discutido mucho sobre la posibilidad de que se produzcan anomalías en los cartílagos u otras artropatías en los caballos, se carece de datos objetivos. Sin embargo, en la actualidad, la enrofloxacin probablemente sólo debería utilizarse en caballos adultos cuando otros antibióticos sean inapropiados. Si se utiliza Baytril® inyectable por vía oral en caballos, puede ser muy irritante para la boca. Esto puede aliviarse recubriendo el líquido con melaza o preparando un gel (abajo) y enjuagando la boca del caballo con agua después de la administración.

Se ha descrito un gel oral formulado a partir del producto inyectable bovino 100 mL de la inyección bovina de 100 mg/mL (Baytril®100). La estevia (0,35 g) se mezcla con aproximadamente 15 mL de enrofloxacin líquida hasta que se disuelva. Se añaden 0,6 mL de aromatizante de manzana hasta que se disuelva. Se espolvorea carboximetilcelulosa de sodio (2 g) se espolvorea sobre la mezcla y se agita hasta que se incorpore. Inmediatamente se empieza a añadir gradualmente la enrofloxacin restante (85 mL) antes de que la mezcla se solidifique.

La concentración aproximada es de 100 mg/mL. Es estable hasta 84 días si se mantiene en el refrigerador y protegido de la luz.

- a) 7,5 mg/kg PO o IV una vez al día para infecciones respiratorias susceptibles
- b) Utilizando el gel compuesto como se ha descrito anteriormente. 7,5 mg/kg PO una vez al día. Los caballos deben estar en ayunas durante 11 - 14 horas antes de la de la dosis y durante 1 a 2 horas después de la dosis, pero deben tener acceso al agua. Enjuagar la boca del caballo con agua después de la dosis para reducir el riesgo de ulceración oral.

Ganado vacuno:

- a) La enrofloxacin (Baytril® 100) está aprobada para el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina asociada a *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus sommus*. Se administra por inyección y está destinado al tratamiento de animales individuales. La dosis indicada es: 2,5 - 5 mg/kg SC una vez al día durante 3 - 5 días o 7,5 - 12,5 mg/kg SC una vez.

El solo usar por receta y no está destinado a su uso en ganado destinado a la producción de leche o en terneros de carne. Los animales destinados al consumo humano no deben ser sacrificados en los 28 días siguientes al último tratamiento.

La FDA prohíbe el uso de fluoroquinolonas en animales destinados a la alimentación.

2 MATERIAL Y MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE ESTE ESTUDIO

En la actualidad existe la metodología tanto de laboratorio (Bennet y Cols 1966) y asimismo de gráficos (King, 1981; Hamilton, 1985; Rahal, 1978) que permiten establecer las tendencias antimicrobianas de los antibióticos, solos o en combinación

Medicamentos: La amoxicilina y la enrofloxacin en sus sales puras fueron obtenidas de MEDICAL VET LABORATORIOS México

Las pruebas in Vitro se llevaron a cabo de acuerdo con el National Committee for Clinical Laboratory Standards de los estados Unidos de Norteamérica. Y adaptado y modificado de acuerdo con la metodología sugerida por Bennet y Cols. (1966). Las suspensiones de *B. subtilis* se realizaron añadiendo el contenido de dos ampulas de suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* (DIFCO) en 100 ml de solución salina normal estéril y 2.5 ml de una solución que contiene 0.3825 de fosfato potásico dibásico y y 0.0833 g de fosfato potásico monobásico para que el pH de la solución de *B. subtilis* tenga un valor de 7.0.

Los estándares de los antibióticos probados fueron desecados al vacío por un mínimo de 48 horas para después pesarlos cuidadosamente y añadidos a una solución para lograr una concentración de 1000µg/ml. Concentración que funciona como solución madre de la cual se hacen las diluciones correspondientes para las pruebas in Vitro.

El efecto de la combinación de florfenicol y lincomicina se analizó haciendo diluciones seriales de los dos agentes antimicrobianos, los cuales fueron mezclados de tal manera que cada hilera y columna estuvieran formadas por una cantidad fija de un agente y cantidades crecientes del otro antimicrobiano. Los rangos de concentración utilizados se basaron en las MIC obtenidas para cada uno de los agentes anti infecciosos utilizados y las bacterias usadas como prueba. Las diluciones cubrieron 4 x MIC (acción antagónica) y 0.25 x MIC (acción sinérgica): Alícuotas de 75 µL de bacterias (c. 1×10^6 cfu/mL) y de 75 µL de cada antibiótico fueron añadidos a cada placa de microtitulación. Como controles, en cada placa se determinó el MIC de cada antibiótico solo y de sus combinaciones.

Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C y el crecimiento bacteriano se inspeccionó visualmente para luego confirmar su concentración con fotómetro (Bausch & Lomb) a una densidad óptima de 540 nm.

Los resultados fueron cotejados y los casos en los cuales se observaron tendencias de sinergia, se recurrió a la representación gráfica de los cambios en MIC y observar su tendencia con los isobologramas resultantes.

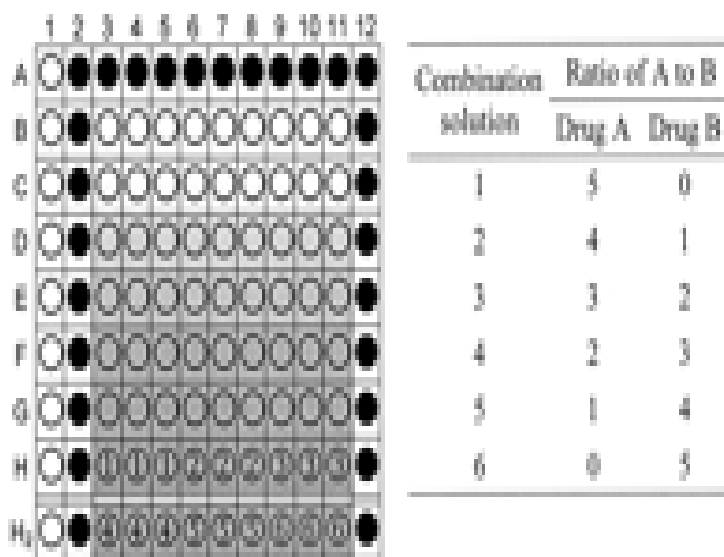
3 RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 siguiente, se puede observar el arreglo experimental para estudiar las propiedades antibioticas de amoxicilina combinado con enrofloxacin; este representa una placa de agar con 96 pozas en las cuales se depositan los germen de referencia y las diferentes concentraciones de los antibioticos y de los cuales se prepararon seis soluciones. Las pozas sin color o claras son las que funcionaron como controles (sin antibiotico y sin bacterias), las pozas oscuras funcionaron como controles para las bacterias (sin antibiotico 0% inhibición del crecimiento) y las pozas etiquetadas del 1 al 6 funcionaron como pozas medicadas para seis combinaciones de las diluciones de antibióticos, en triplicado, mientras que las pozas de la hilera H recibieron la concentración mas alta de combinación de antibióticos. Se hicieron dos placas con 96 pozas en las cuales la hilera H2 representa las soluciones 4 a 6 de la segunda placa de agar con 96 pozas.

En las combinaciones de antibióticos las proporciones utilizadas A corresponde a amoxicilina mientras que B corresponde a la enrofloxacin.

Estos resultados se pueden observar en el siguiente cuadro:

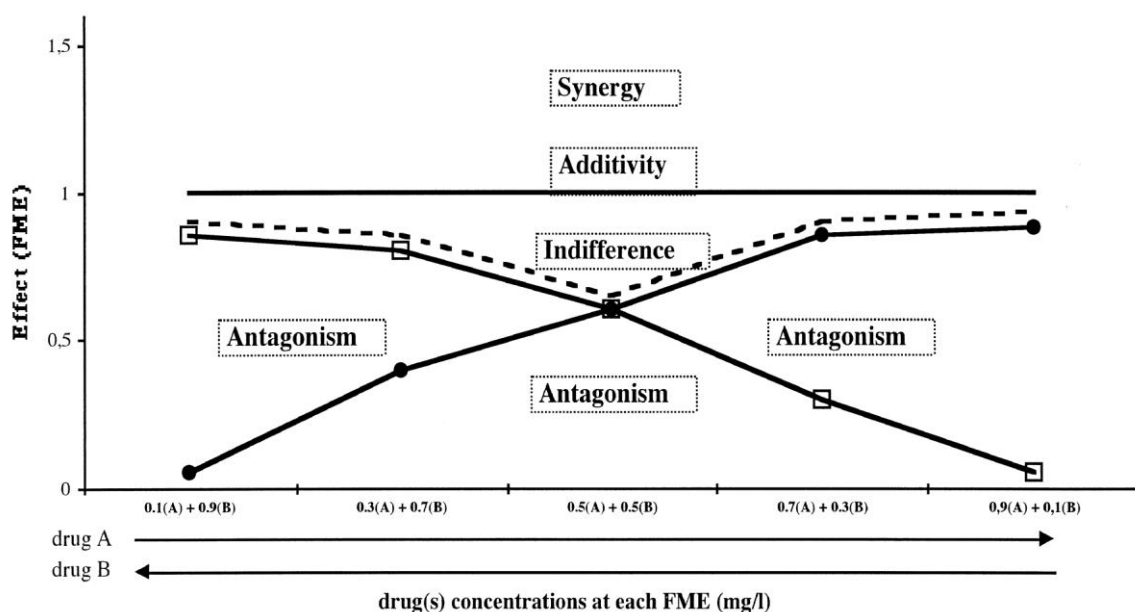
Figura 1 arreglo experimental para estudiar las propiedades antibioticas de amoxicilina combinado con enrofloxacin



Cuadro 1 Los valores de la representación gráfica de los cambios en MIC y observar su tendencia con los isobologramas resultantes en una combinación de florfenicol con tilosina tartrato en las soluciones con las proporciones mencionadas.

Solución	proporción de A con B		Valor de MIC
	Antibiotico A	antibiotico B	
1	5	0	1.0
2	4	1	1.1
3	3	2	1.46
4	2	3	1.3
5	1	4	1.15
6	0	5	1.0

La grafica de nuestros resultados se realizó de acuerdo al siguiente esquema (:Desbiolles y Cols. 2000)

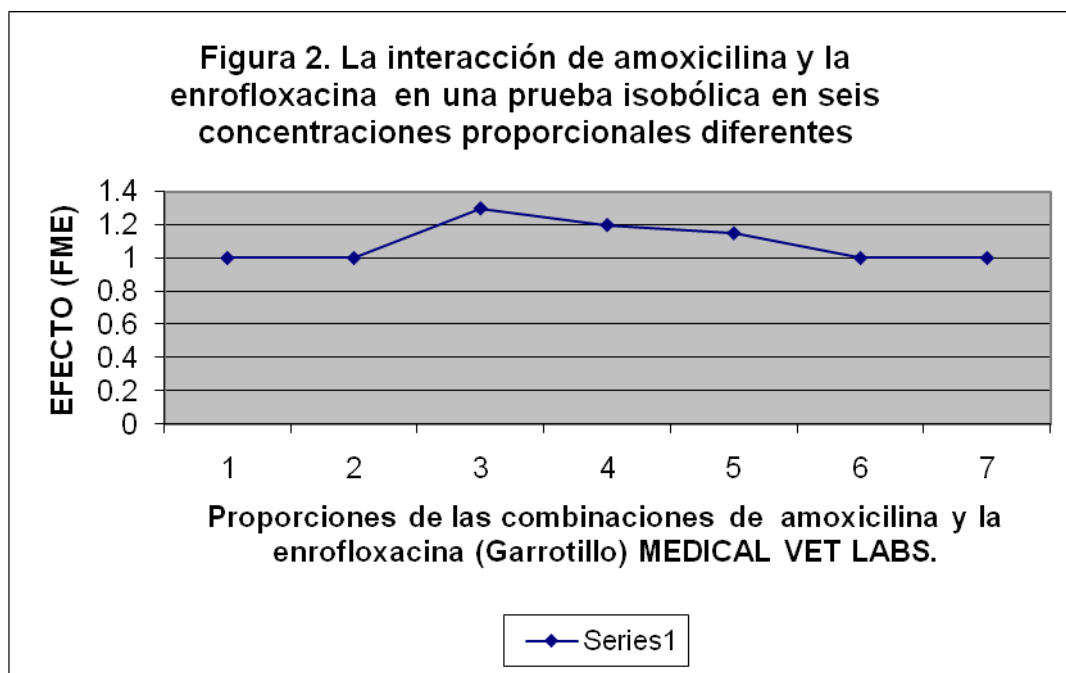


Cuando se aplican los resultados correspondientes observados en el cuadro 1 la gráfica resultante es como se puede observar en la figura 2, y en la cual se pueden observar las tendencias de las combinaciones en cuanto a las proporciones de los mismos utilizados en las pruebas de interacción.

La gráfica no concuerda con lo expresado en la introducción, para esta interpretación se debe tomar en cuenta el efecto de las combinaciones antibióticas utilizadas de acuerdo al esquema

En este estudio se puede observar que existe una tendencia a la sinergia en las combinaciones 2 a 5, pero se hace aparente que las combinaciones 3 y 4 son las representativas de una sinergia antibiótica deseable. En esta combinación se utiliza la proporción de 1 a 4 para florfenicol y tilosina tartrato, respectivamente, resultados que concuerdan con otros estudios parecidos con diferentes compuestos químicos y antibióticos (Ulvatne, 2001) en contra de *E. coli*.

En la siguiente figura se puede observar el resultado gráfico (Figura 2).



En Función de los resultados obtenidos con este estudio se puede postular que la combinación antibiótica de amoxicilina con enrofloxacin utilizada entre las proporciones 3 y 4 es adecuada para su uso en las enfermedades de los cerdos y aves producidas por germen susceptible a la combinación estudiada. Para finalmente concluir que la combinación antibiótica de proporción de 3 : 2 y 2 : 3 respectivamente, son las que presentan el mejor efecto sinérgico.

REFERENCIAS

- Batrawi N, Wahdan S, Al-Rimawi F. 2017 A Validated Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Amoxicillin and Enrofloxacin Combination in an Injectable Suspension. *Scientia Pharmaceutica*; 85(1):6. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010006>
- Bennet, J. V., Brodie J. L.; Benner, E. J., Kirby, W. M.M. 1966 Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *App. Microbiol.* 14: 170 -177
- Burch, DGS, Sperling, D. 2018 Amoxicillin—current use in swine medicine. *J vet Pharmacol Therap*; 41: 356– 368. <https://doi.org/10.1111/jvp.12482>
- Davis JL, Foster DM, Papich MG.** 2007 Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007 Dec;30(6):564-71.
- Desbiolles N, Piroth P, Lequeu C, Neuwirth C, Portier H, Chavanet P. Método de efecto máximo fraccional para la sinergia in vitro entre amoxicilina y ceftriaxona y entre vancomicina y ceftriaxona contra *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia* 45, 12, 1 2001, 3328-3333. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.33283333.2001>
- Hamilton-Miller, J. M. T. 1985. Rationalization of terminology and methodology in the study of antibiotic interaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 15:655-658
- King, T. C., D. Schlessinger, and D. J. Krogstad. 1981. The assesment of antimicrobial combinations. *Rev. Infect. Dis.* 3:627-633
- Lewicki K. 2006 TYLOSIN A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/tylosin_2006.pdf
- MCKELLAR, Q., IAN GIBSON,¹ ANA MONTEIRO,¹ AND MIGUEL BREGANTE 1999 Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Danofloxacin in Plasma, Inflammatory Exudate, and Bronchial Secretions of Calves following Subcutaneous Administration *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 43: 1988–1992
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. Performance for antimicrobial susceptibility testing. Standard M100-S5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Nedbalcova K., Zouharova M., Sperling D. 2019: Post-antibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin and amoxicillin against selected respiratory pathogens of pigs. *Veterinarni Medicina*, 64: 67-77.
- Rahal, J. J. 1978. Antibiotic combinations: the clinical relevance of synergy and antagonism. *Medicine* 57:179-195
- Ruiz, J. G. Antibioticos 2000. En *Farmacología Veterinaria*. Autor: Victor O. Fuentes, ISBN 970-27-0165-1 Comision Editorial de la Universidad de Guadalajara Mexico p 60 - 150