

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA



Av. Circunvalación – Cda. 29 San Borja
Telf. 435-3348 – Anexo 237

EFECTIVIDAD DE LA COMBINACIÓN TILOSINA + GENTAMICINA (TYLO COMBISONE®) FRENTE A *Streptococcus pneumoniae* EN RATONES DE LABORATORIO

Olga Li Elias
Jefe del Laboratorio de
Patología Clínica

Arnaldo Alvarado S.
Área De Microbiología

San Borja, 15 de Agosto del 2005

Índice

Lista de Tablas	pág. 2
Lista de Fotos	pág. 2
1. Introducción	pág. 3
2. Antecedentes	pág.4
2.1. Gentamicina	pág. 4
2.2. Tilosina	pág. 4
2.3. Tylo Combisone®	pág. 5
2.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	pág. 6
2.5. Modelo Experimental	pág. 7
3. Materiales y Métodos	pág. 8
3.1. Microorganismos (<i>S. pneumoniae</i>)	pág. 8
3.2. Modelo de Infección en Ratones	pág. 8
3.3. Administración de Antibióticos	pág. 9
3.4. Cultivo Bacteriano	pág. 11
3.5. Evaluación Clínica	pág. 12
3.6. Análisis estadístico	pág. 13
4. Resultados y Conclusiones	pág. 14
4.1. Actividad in Vivo	pág. 14
5. Discusión	pág. 17
6. Conclusiones	pág. 18
7. Bibliografía	pág. 19

Lista de Tablas

Tabla Nº 1. Curso clínico de neumonía por *S. pneumoniae* en ratones

Tabla Nº 2. Eficacia de los diferentes tratamientos en neumonía experimental causada por *S. pneumoniae*

Lista de Fotos

Foto Nº 1. Aplicación de *S. pneumoniae* en ratones en el muslo

Foto Nº 2. Aplicación de *S. pneumoniae* en ratones en el muslo

Foto Nº 3. Dilución de Tylo Combisone®

Foto Nº 4. Dilución de Tylo Combisone®

Foto Nº 5. Aplicación del Antibiótico Tylo Combisone®

Foto Nº 6. Extracción del Muslo

Foto Nº 7. Extracción del Muslo

Foto Nº 8. Machacado y Extracción del Sobrenadante

Foto Nº 9. Machacado y Extracción del Sobrenadante

Foto Nº 10. Ratones con Actividad Normal

Foto Nº 11. Ratón Muerto

1. INTRODUCCION

Desde hace dos décadas las combinaciones de antibióticos constituyen una práctica común en el tratamiento empírico inicial de las infecciones graves, basándose en su superioridad o mayor efectividad sobre el tratamiento con un solo agente antimicrobiano (monoterapia) (Moellering, 1983).

Los fundamentos de su utilización se estructuran en tres apartados:

1. Incremento de la actividad bactericida y de la rapidez de la lisis bacteriana
2. Prevención del desarrollo de resistencias bacterianas durante el tratamiento
3. Aumento de la actividad antimicrobiana en pacientes de alto riesgo (inmunodeprimidos), en espera de la información microbiológica (Rahal, 1983).

La principal base farmacológica para el uso de combinación de antibióticos radica en disponer de combinaciones de antimicrobianos con un elevado grado de actividad; es decir, conseguir mantener durante largo tiempo concentraciones plasmáticas altas, por encima de las CMI de los microorganismos patógenos causantes de estas infecciones. De esta forma se logra un incremento significativo de la actividad bactericida, elemento de influencia significativa y de mayor correlación con la mejor respuesta terapéutica y su mejor evolución (Fantin, et al., 1991).

2. ANTECEDENTES

2.1. GENTAMICINA

La Gentamicina es un antibiótico aminoglucósido obtenido a partir de la *Micromonospora purpurea*. Este antibiótico es producto de la mezcla de tres fracciones. La sal más común es el sulfato. Es hidrosoluble y relativamente termoestable. Su mecanismo de acción es a dos niveles; en la membrana celular, al fijarse en receptores presentes en la membrana celular ocasiona un trastorno en la permeabilidad de la misma provocando la salida de líquidos y sustancias nutritivas; a nivel de síntesis de proteínas, se une a la fracción ribosomal 30s alterando la función del RNAm.

La gentamicina es útil contra una gran variedad de bacterias, entre las cuales destacan *E. coli*, especies de *Proteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* especies de *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Pasteurella*. A pesar de su eficacia in vitro, no tiene acción importante in vivo contra especies de Mycoplasma.

Se ha combinado con Ampicilina o Amoxicilina, siendo de esta forma de gran utilidad contra *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y especies de *Pasteurella*. La gentamicina es utilizada en gran cantidad de procesos infecciosos incluyendo infecciones de las vías urinarias y respiratorias.

2.2. TILOSINA

La Tilosina es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, de uso exclusivo en Medicina Veterinaria. Se caracteriza químicamente por poseer un anillo lactona sumamente grande en su estructura. Estos macrólidos son glucósidos, en los que la lactona está unida a dos azúcares, uno de los cuales es una amino-azúcar. Este macrólido al igual que los demás macrólidos se obtiene de una cepa de *Streptomyces fradie*, aislada del suelo (Sumano, 1997).

La Tilosina es activa frente a agentes Gram-positivos, con especial acción sobre *Mycoplasma gallisepticum* S6. También actúa frente a algunos agentes Gram-negativos, espiroquetas y leptospiras. Las bacterias sensibles a la tilosina son principalmente *Mycoplasma spp.*, *Bordetella*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, entre otros.

La Tilosina se considera bacteriostático, su mecanismo de acción se lleva a cabo afectando la producción proteínica, al inhibir la función de la subunidad ribosómica 30s. Se une a las proteínas plasmáticas y tiene un alto grado de liposolubilidad. Gracias a esto, tiene una amplia distribución en los fluidos corporales y los tejidos animales. A mostrado efectividad contra Neumonía enzoótica, procesos respiratorios con complicación micoplásmica, agalaxia, pleuroneumonía.

El tartrato de tilosina es eficaz en la prevención o el tratamiento de la enfermedad crónica respiratoria. Asimismo es útil la administración de tilosina después de aplicar las inmunizaciones o de cualquier tipo de tensión.

2.3. Tylo Combisone®

Tylo Combisone® es una asociación antibiótica, antiinflamatoria y antihistamínica específica en el tratamiento de infecciones bacterianas de toda etiología, que involucren asimismo procesos inflamatorios o alérgicos.

Cada 100 ml de solución contiene:

Tilosina tartrato	15 g
Gentamicina sulfato	6 g
Dexametasona 21 fosfato	0.0265 g
Clorfenamina maleato	0.750 g

Está descrito como una solución inyectable acuosa sobre la base de dos antibióticos, uno de amplio espectro y un macrólido. Asociados con un antiinflamatorio glucocorticoide y una antihistamínico de uso sistémico. Los antibióticos presentes en Tylo Combisone® proporcionan un tratamiento sinérgico eficaz en el tratamiento de

infecciones relacionadas con agentes sensibles a la Tilosina y la Gentamicina. La concentración sanguínea de la Tilosina alcanza su máxima concentración sanguínea después de 3 o 4 horas de su administración. La Gentamicina es un antibiótico aminoglucósido bactericida de amplio espectro.

La combinación de ambos antibióticos proporciona un amplio espectro de acción contra:

- Micoplasmas.- *M. hyosinoviae*, *M. hyopneumoniae*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae*
- Gram positivos.- *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp.
- Gram negativos.- *Campylobacter coli*, *Neisseria* spp., *Sherophorus necrophorus*, *Actinobacillus* spp., *Pasteurella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* entre otros.

2.4. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneuminae, son cocos gram-positivos. Son bacterias ubicuas transmitidas por portadores de los gérmenes que causa infecciones en los seres humanos y los animales. La neumonía y la septicemia del ternero de pocas semanas de edad son infecciones clásicas causadas por este agente. El curso de la septicemia es generalmente sobreagudo con terminación mortal después de unas semanas (Jakes, 1985).

Las bacteremias (con la implicación del pulmón y del bazo) son las presentaciones clínicas más comunes de los terneros. Entre los antibióticos la penicilina, ampicilina (o amoxicilina) aparecen ser los más eficaces. Como alternativos hay que considerar a los macrólidos (eritromicina, tilosina). Sabemos por medicina que la asociación de penicilinas y aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina) son sinérgicas (Jakes, 1985.)

2.5. MODELO EXPERIMENTAL

La evaluación de regímenes terapéuticos en modelos experimentales de la estreptococosis debe considerar otras combinaciones sinérgicas. En el presente estudio, utilizamos un nuevo modelo de ratones para comparar la actividad antibacteriana y la eficacia clínica de la combinación Tilosina más Gentamicina (Tylo Combisone) con la administración individual (monoterapia) de la Tilosina y la Gentamicina. La Tilosina fue elegida porque, al igual que otros macrólidos su MICs contra *Streptococcus pneumoniae* se extiende entre 0,01 y 0,5 ug/ml (Moellering, 1983), y la mayoría de las cepas son eliminadas por concentraciones de < 1 ug/ml (Jakes, 1985).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MICROORGANISMOS (*Streptococcus pneumoniae*)

La cepa de *Streptococcus pneumoniae* usado en el actual estudio fue aislada de un ternero con un cuadro neumónico, identificado con el sistema API 20 Strep (Bio-Mérieux S.A. - France) y se probó su sensibilidad con la determinación de MICs, para Gentamicina (0.12 ug/ml) y para Tilosina (0.25 ug/ml).

Las bacterias fueron cultivadas en el medio de placas de agar sangre y se cultivaron una colonia durante toda la noche en medio de infusión cerebro corazón.

Para la infección, 50 ul de ese cultivo, fueron diluidos en 10 ml de medio fresco e incubados a 37°C durante toda la noche, y suspendido de nuevo en solución salina al 0.9% que se utilizó como el inóculo. La exactitud del tamaño de inóculo fue confirmado por cultivos cuantitativos para cada experimento.

3.2. MODELO DE INFECCIÓN EN RATONES

El modelo utilizado es una modificación del modelo de la meningitis streptococcal del grupo B en las ratas infantiles descritas previamente (Kim et al., 1995; Leib et al., 1996). Los ratones que pesaban entre 18 a 22 g de diferentes sexos fueron infectadas por la inyección directa intramuscular en los dos muslos con 0.1 ml de una suspensión de 5×10^4 a 1×10^5 CFU de *Streptococcus pneumoniae* en solución salina estéril usando una aguja 23-gauge.



Foto N° 1 y 2. Aplicación de *S. pneumoniae* en ratones en el muslo

Después de la infección, los ratones fueron devueltos a sus jaulas. A las 2 h después de la infección, se tomaron muestras de sangre extraída por el seno retroorbital y se cultivaron para cuantificar *Streptococcus pneumoniae* en septicemia.

El tratamiento fue iniciado 2 h después de la infección, y los animales recibieron los antibióticos por 2 días consecutivos (es decir, recibiendo cuatro inyecciones antibióticas). Los ratones fueron sacrificados por la inyección intraperitoneal del pentobarbital (200 mg/kg) 24 h después de la última inyección de antibióticos o cuando entraron en agonía.

3.3. ADMINISTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

El Sulfato de Gentamicina pura al 65.8% en polvo, Tartrato de Tilosina pura al 92.7% en polvo y la combinación Tilosina + Gentamicina (Tylo Combisone®), al 15% y 6%, respectivamente fue proporcionado por Agrovvet Market S.A. - Perú.

Los animales fueron seleccionados al azar formando grupos para recibir compuesto salino que fue el Grupo Control (C) y los que recibieron los principios

activos formándose el Grupo de Tratamiento Tilosina + Gentamicina (T+G), Tilosina (Ti) y Gentamicina (Gt) . Todos los antibióticos fueron disueltos o diluidos en agua estéril y fueron inyectados vía intraperitoneal en un volumen del 100 μ l. La tilosina fue dosificada en 15 mg/kg, la gentamicina en la dosis de 6 mg/kg y la combinación Tilosina+Gentamicina (Tylo Combisone®) 15 mg/kg + 6 mg/kg, administrados dos veces por día.



Foto N° 3 y 4. Dilución de Tylocombisone



Foto N° 5. Aplicación del Antibiótico Tylo Combisone

3.4. CULTIVO BACTERIANO

Inmediatamente después de muerte o del sacrificio, con ayuda de material quirúrgico (pinzas, bisturí y tijeras) se extrajeron los muslos del ratón y los pulmones, separando la piel, luego cortando el músculo y los pulmones, por separado, en pequeños trozos se llevaron a un mortero de porcelana estéril, añadiéndole 9 ml de solución salina (dilución 1:10 del número de bacterias en el muslo) y homogenizando durante 3-5 minutos con arena de mar estéril.

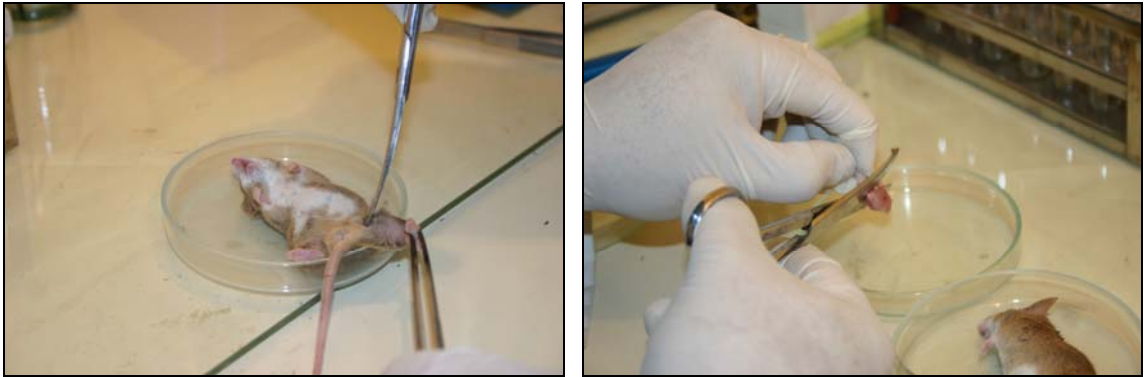


Foto Nº 6 y 7. Extracción del Muslo

A continuación se tomó el sobrenadante del mortero y se procedió al recuento de microorganismos. Las cuentas bacterianas en sangre fueron determinadas por cultivo no diluido (0,1 ml) y por dilución en serie de la muestra de sangre. Los resultados fueron expresados en log₁₀ CFU por gramo del tejido con un límite de detección de 20 CFU/g. Para la sangre, las cuentas bacterianas fueron expresadas como log₁₀ CFU por mililitro, con límites de detección de 10 y 100 CFU/ml, respectivamente.

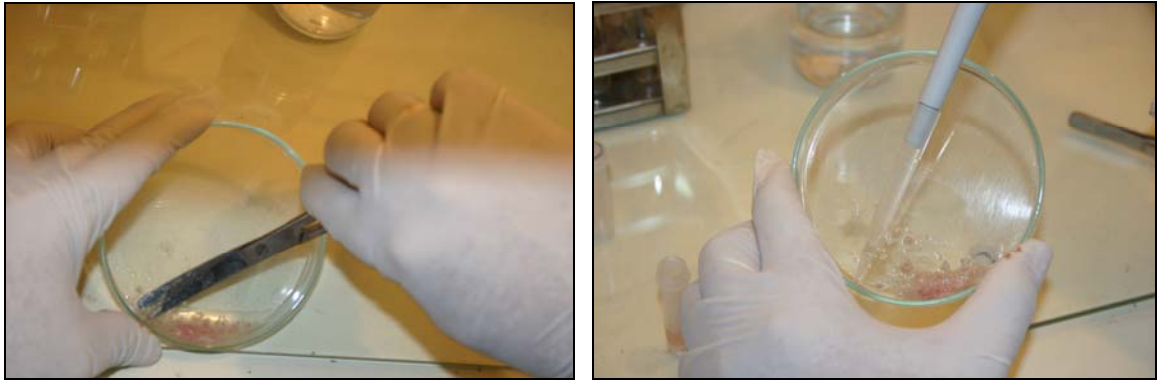


Foto Nº 8 y 9. Machacado y Extracción del Sobrenadante

3.5. EVALUACIÓN CLÍNICA

La severidad clínica de enfermedad fue evaluada en cada animal 20 h después de la infección y desde entonces dos veces al día hasta la muerte. La escala fue calificada a partir de 0 a 5 como sigue:

0. Muerte del Animal
1. Estado de Coma
2. Enfermedad Severa. Letargia sin ambulación
3. Enfermedad Moderada. Evidencia de Respiración Abdominal, forzada
4. Enfermedad Leve o Mínima.
5. Actividad Normal. Comportamiento y Ambulación normal

El tiempo de supervivencia fue determinado como el tiempo entre la infección y la muerte espontánea o el momento de sacrificar después de la terminación de la terapia antibiótica (es decir, 48h de tratamiento con todos los regímenes).



Foto Nº 10. Ratones con Actividad Normal



Foto Nº 11. Ratón muerto

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como media \pm la desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por análisis de varianza unidireccional. En caso de que hubiese significancia ($P < 0,05$), esto fue seguida por la prueba de Newman-Keuls para comparaciones de parejas. Las proporciones fueron comparadas por la prueba exacta de Fisher.

4. RESULTADOS

A las 20 h después de la infección del intramuscular (muslo), los ratones enfermaron, con muestras de la actividad reducida (véase la tabla 1), pérdida de peso (que no excede el 2% del peso corporal) y con neumonía documentada con el examen macroscópico y resultado de cultivo de la muestra del pulmón.

Todo animal sacrificado en H₂O (n = 13) era bacterémico (media 2,64 el \pm 0,17 log₁₀ CFU/ml). Al mismo tiempo, las muestras del músculo y del pulmón exhibieron altos títulos bacterianos (músculo 7,8 \pm 0,7 log₁₀ CFU/g; pulmón 6,7 \pm 0,6 log₁₀ CFU/g) (véase Tabla N° 2).

4.1. ACTIVIDAD IN VIVO

Todos los animales que se trataron con la combinación Tilosina + Gentamicina (TG) (Tylo Combisone®) sobrevivieron con la duración completa de la terapia (P < 0,05) comparado con los animales del Grupo Control (C). Los tiempos de supervivencia fueron también los más largos para la combinación Tilosina + Gentamicina (Tylo Combisone®), siendo de 48 horas, aunque el tiempo más corto fue para los animales del Grupo Control. El tiempo obtenido de la combinación Gentamicina + Tilosina (Tylo Combisone®) fue mayor que en los grupos de animales tratados con la antibióticos individualmente (Grupos Ti y Gt) (P < 0,05; Tabla 1).

El cuadro clínico era similar entre grupos al principio de la terapia. Al final de la terapia (48 horas), los animales tratados solo con el régimen de Tilosina tenían enfermedad más severa que los animales tratados con los regímenes más eficaces (P < 0,05 contra el Gentamicina y combinación Tilosina+ Gentamicina; Tabla 1).

Tabla Nº 1. Curso Clínico de Neumonía por *S. pneumoniae* en ratones

Grupo	Dosis (mg/kg)	Nº Inyecciones por día	Nº Animales	Escore de Enfermos		Tiempo de Monitoreo (horas)	Nº de Sobrevivientes (%)
				H20	H48		
TG	15+6	2	13	3.6 ± 0.6	4.5 ± 0.7	88 ± 0 ^c	13 (100) ^b
Ti	15	2	13	3.7 ± 0.6	4.7 ± 0.5	76 ± 18	8 (61)
Gt	6	2	13	3.6 ± 0.4	3.7 ± 0.8 ^a	70 ± 17	7 (55)
Control	0	2	12	3.6 ± 0.8	ND ^e	51 ± 20 ^d	2 (17)

TG: Grupo Tratamiento Tilosina + Gentamicina (Tylo Combisone®)

Ti: Grupo Tratamiento Tilosina

Gt: Grupo Tratamiento Gentamicina

Control: Solución salina

^a P < 0.05 versus Ti y TG.

^b P < 0.05 versus Gt y C.

^c P < 0.05 versus Gt y C.

^d P < 0.05 versus todos los grupos

^eND, no determinado.

El resultado bacteriológico fue analizado sobre todo para los animales que terminaban el período entero del tratamiento. Todos los regímenes antibióticos demostraron actividad significativa comparada a los controles no tratados (Tabla 2). Mientras que los ratones no tratados (C) fueron uniformemente bacterémicos a la hora de la muerte ($3,3 \pm 0,6 \log_{10}$ CFU/ml), los cultivos de la sangre de animales tratados estaban debajo del límite de la detectabilidad ($< 1 \log_{10}$ CFU/ml), a excepción del grupo de ratones tratados con Gentamicina donde 5 de 13 ratones (el 40%) tenían cultivos positivos de la sangre (Tabla 2). En el músculo (muslo), la combinación Tilosina +Gentamicina demostró la mejor actividad, con un título bacteriano menor por gramo del tejido que fueron aproximadamente entre 1 y 2

log₁₀ CFU/ml más bajos que con cualquier otra terapia (P < 0,05 contra el resto de los grupos; Tabla 2). En el pulmón, los dos regímenes más eficaces, la combinación Tilosina+ Gentamicina (TG) y Tilosina (Ti) tuvieron actividades similares y fueron perceptiblemente mejores que los regímenes de la comparación (P < 0,05; Tabla 2).

La inclusión de los animales que morían antes de la terminación de la terapia no alteró perceptiblemente estos resultados, aunque los animales que morían prematuramente tenían títulos levemente más altos que los animales que recibían el tratamiento completo (datos no mostrados).

Tabla Nº 2. Eficacia de los diferentes Tratamientos en Neumonía experimental causada por *S. pneumoniae*

Grupo	Dosis (mg/kg)	Nº Inyecciones por día	Nº Animales	Títulos en Muslo (log ₁₀ CFU/g)	Títulos en Pulmón (log ₁₀ CFU/g)	Títulos en Sangre (log ₁₀ CFU/ml)
TG	15+6	2	13	4.1 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.6	<1
Ti	15	2	13	5.0 ± 0.4	2.7 ± 0.8	<1
Gt	6	2	13	6.1 ± 1.0 ^a	4.2 ± 0.9 ^d	1.4 ± 0.7 ^c
Control	0	2	12	7.9 ± 0.8	7.0 ± 0.8	3.3 ± 0.6

TG: Grupo Tratamiento Tilosina + Gentamicina (Tylo Combisone®)

Ti: Grupo Tratamiento Tilosina

Gt: Grupo Tratamiento Gentamicina

Control: Solución salina

^a P < 0.05 versus Ti.

^b P < 0.05 versus todos los otros grupos.

^c P < 0.05 versus C.

^d P < 0.05 versus Ti, TG, y C.

5. DISCUSION

En el actual estudio, hemos comparado una terapia combinada de antibióticos (macrólido + aminoglucósido) con los mismos antibióticos pero en forma individual (monoterapia), para la infección con *Streptococcus pneumoniae*. Todos los regímenes de tratamiento mostraron actividades antibacterianas en músculos, los pulmones y la sangre de ratones con la neumonía experimental sistémica. Sin embargo, la combinación Tilosina + Gentamicina (Tylo Combisone®) fue más activo en los músculos que los regímenes de la comparación demostrándose así que la combinación tenían un efecto aditivo contra *Streptococcus pneumoniae*.

El actual modelo combina varias características importantes de la enfermedad en los animales y permitió un análisis detallado de títulos bacterianos en el músculo, la sangre, y el pulmón (como órgano representativo de la enfermedad neumónica). Además, la bacteremia es una característica importante en los terneros (Jakes, 1985) y estuvo uniformemente presente en los ratones infectados a pesar de la ruta intramuscular de la infección.

Si bien en los resultados se observó que la monoterapia con Tilosina tuvo un buen efecto bactericida, casi comparable con la combinación tilosina + gentamicina, en el grupo tratamiento tilosina, los animales presentaron un cuadro clínico más severo, enfermándose un mayor número de animales. Esto permite concluir recomendando la combinación Tilosina + Gentamicina para el tratamiento de neumonías en animales, ya que fue el régimen más eficaz probado en el laboratorio. Sin embargo, su potencia en los animales domésticos con neumonías no fueron comparados con otros tratamientos.

6. CONCLUSIONES

- Ninguno de los animales del grupo Tilosina + Gentamicina murió a causa de la infección experimental con *Streptococcus pneumoniae*.
- A partir de los resultados obtenidos se puede ensayar la conclusión de que la combinación de los antibióticos Tilosina y Gentamicina, tienen un efecto sinérgico que se revela en un mayor efecto bactericida. Es por esto, que se visualiza clínicamente como una disminución en los signos clínicos y por tanto, en una mejor evolución de los animales afectados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Moellering, R.C. Jr. Rationale for use of antimicrobial combinations Am J Med 1983; 29 (Suppl.): 4-8.
- Rahal, J. Rationale for use of antimicrobial combinations in treatment of Gram-negative infections. Am J Med 1983; 29 (Suppl.): 68-71.
- Fantin, B., Leggett, J., Ebert, S., Craig, W.A. Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against Gram-negative bacilli in a murine infection model. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1413-1422.
- Jakes N. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria.1985.Editorial Acribia. España. Pp. 275.
- Kim, Y. S., R. A. Sheldon, B. R. Elliott, Q. Liu, D. M. Ferriero, and M. G. Täuber. 1995. Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group B streptococci. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54:531-539
- Leib, S. L., Y. S. Kim, L. L. Chow, R. A. Sheldon, and M. G. Täuber. 1996. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. J. Clin. Investig. 98:2632-2639
- Sumano, Ocampo. Farmacología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1997