



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias**

Tesis de Doctorado

**FARMACOCINETICA DE AZITROMICINA EN
VACAS LECHERAS HOLANDO ARGENTINO**

Esteban Turic

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**FARMACOCINETICA DE AZITROMICINA EN
VACAS LECHERAS HOLANDO ARGENTINO**

Autor: Med Vet. Esteban Turic

Director: Prof. Dr. Jorge O. Errecalde

Codirector: Prof. Dra. Nora Mestorino

Lugar de trabajo:

Cátedra de Farmacología Farmacotecnia y Terapéutica.

Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional de La Plata.

2000-2010

Miembros del Jurado

Dr. Prof. Carlos Lanusse

Dr. Prof. Rodolfo Rothlin

Dr. Prof. Modesto Rubio

TABLA DE CONTENIDOS

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN	4
II.1. Fundamentos de la elección del tema	5
II.1.1. Mastitis bovina y consideraciones generales sobre terapia antimicrobiana	5
II.1.1.1. Tratamiento parenteral	8
II.1.1.2. Tratamiento intramamario	10
II.1.2. Azitromicina	13
II.1.2.1. Actividad antimicrobiana	15
II.1.2.2. Farmacocinética y farmacodinamia	16
II.1.2.3. Toxicidad	19
II.2. Hipótesis	20
II.3. Objetivos	21
II.3.1. Objetivos generales	21
II.3.2. Objetivos específicos	21
III. MATERIALES	22
III.1. Formulación experimental	23
III.1.1. Intramamaria Secado	23
III.1.2. Intramamaria Lactación	23
III.1.3. Intramuscular	23
III.1.4. Endovenosa	23
III.2. Animales experimentales	24
III.2.1 Grupos experimentales	24
III.2.1.1. Criterios para selección animal	24
III.2.1.2. Criterios inclusión	25
III.2.1.3. Criterios de no inclusión	25
III.2.1.4. Criterios de exclusión	25
III.3. Instrumental y equipamiento	26
III.3.1. Instrumental y equipamiento de campo	26
III.3.2. Instrumental y equipamiento de laboratorio	27
IV. MÉTODOS	29
IV.1 Manejo animal, alimentación, identificación	30
IV.2. Descripción de dosis y administración	30
IV.2.1. Administración endovenosa	30
IV.2.3. Administración intramuscular	30
IV.2.3. Administración intramamaria	30
IV.3. Toma de muestras y conservación	31
IV.3.1. Muestras de sangre	31
IV.3.2. Muestras de leche	31
IV.4. Análisis de las muestras	32
IV.4.1. Técnica analítica	32
IV.4.1.1. Fundamento	32
IV.4.1.2. Desarrollo analítico y descripción del método	32
IV.4.1.3. Validación	35

V. EXPERIMENTOS REALIZADOS	43
V.1. Análisis farmacocinético de azitromicina luego de su administración endovenosa en vacas lecheras Holando Argentino en lactación, sanas y con mastitis subclínica	44
V.2. Análisis farmacocinético de azitromicina luego de su administración Intramuscular en vacas lecheras HA en lactación, sanas y con mastitis subclínica	44
V.3. Análisis farmacocinético de azitromicina luego de sus administración Intramamaria en vacas lecheras HA en lactación, sanas y con mastitis subclínica	44
V.4 Análisis farmacocinético de azitromicina luego de sus administración intramamaria en vacas lecheras al momento de secado sanas y con mastitis subclínica	45
V.5. Estudio de penetración de azitromicina en tejidos	45
VI. RESULTADOS	47
VI.1. Resultados del ensayo endovenoso	50
VI.1.1. Concentraciones en suero y leche	52
VI.1.2. Análisis farmacocinético nocompartimental	57
VI.1.2.1 Análisis estadístico	63
VI.2. Resultados del ensayo intramuscular	64
VI.2.1. Concentraciones en suero y leche	66
VI.2.2. Análisis farmacocinético nocompartimental	71
VI.2.2.1 Análisis estadístico	77
VI.3. Resultados del ensayo intramamario en lactancia	78
VI.3.1. Concentraciones en suero y leche	80
VI.3.2. Análisis farmacocinético nocompartimental	85
VI.3.2.1 Análisis estadístico	91
VI.4. Resultados del ensayo intramamario al secado	92
VI.4.1. Concentraciones en suero y leche	94
VI.4.2. Análisis farmacocinético nocompartimental	99
VI.4.2.1 Análisis estadístico	105
VI.5. Estudio de penetración de azitromicina en tejidos	106
VII. DISCUSION	111
VI.1. Fundamento de la elección del modelo de análisis farmacocinético	112
VI.2. Resumen	116
VI.3. Ensayo Endovenoso	117
VI.4. Ensayo Intramuscular	122
VI.5. Ensayo Intramamario en lactancia	127
VI.6. Ensayo Intramamario al secado	132
VI.7. Estudio de penetración de azitromicina en tejidos	135
VIII. CONCLUSIONES	137
VIII.1. Comentarios Acerca de las hipótesis planteadas	138
VIII.2. Conclusiones finales	138
IX. BIBLIOGRAFIA	140

Abreviaturas y símbolos

AUC_{0-24h}	Área bajo la curva de concentraciones en función del tiempo desde el momento 0 hasta las 24 h
$AUC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de concentraciones en función del tiempo desde el momento 0 al infinito
AZI	Azitromicina
BC	Bicompartimental
°C	Grados centígrados
C_c	Concentración calculada
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cl	Aclaramiento o clearance
cm	Centímetros
C_i	Concentración inicial
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
C_r	Concentración real
CV	Coefficiente de variación
DE	Desvío estándar
EPA	Efecto post-antibiótico
F	Biodisponibilidad farmacológica
$F_{l\acute{a}ctea}$	Disponibilidad láctea
g	Gramos
h	Hora/s
IMM	Intramamaria
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
kg	Kilogramos

L	Litros
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
M	Molar
MC	Monocompartimental
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m/m	Masa en masa
min	Minutos
m/v	Masa en volumen
n	Número de mediciones
NMC	National Mastitis Council
nm	Nanómetros
PK	Farmacocinética/o
PD	Farmacodinamia
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PO	Oral
SCC	Recuento de células somáticas
$T_{\text{máx}}$	Tiempo al que se alcanza la $C_{\text{máx}}$
$T_{1/2\lambda}$	Semivida de eliminación (cinética no compartimental)
λ	Constante de la tasa de eliminación (cinética no compartimental)
MRT	Tiempo medio de residencia
Vd	Volumen de distribución aparente
Vss	Volumen de distribución al estado estable
\bar{X}	Media aritmética
X_i	Valor adjudicado a cada observación

Σ	Sumatoria
μ	Media poblacional
μg	Microgramos
μL	Microlitros
∞	Infinito

I. RESUMEN

Título: Farmacocinética de Azitromicina en Vacas Lecheras Holando Argentino**Palabras claves:** Azitromicina, Mastitis bovina, Farmacocinética**Resumen:**

El prototipo de una clase de antibióticos conocido como macrólidos fue introducido en 1952 con el nombre eritromicina. La azitromicina (AZI) es un compuesto semisintético en el cual se ha expandido el anillo lactónico de la eritromicina para formar un compuesto con una estructura anular de 15 miembros que posee en humanos una mayor tolerancia gástrica, mejor perfil farmacocinético, acumulación en células inflamatorias y un espectro de actividad mayor. Estas características hacen pensar que la azitromicina pueda tener un futuro promisorio en medicina veterinaria para ciertas infecciones del bovino como las producidas en la glándula mamaria. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar el comportamiento farmacocinético de AZI en sangre y leche luego de administración por diferentes vías y en vacas lecheras sanas y con mastitis. Las concentraciones en sangre y leche fueron determinadas por método microbiológico y analizadas por el modelo farmacocinético descriptivo no compartimental. El comportamiento observado luego de administración por cualquiera de las vías analizadas fue típico de los macrólidos con bajas concentraciones en plasma y concentraciones muy altas en leche y tejidos blandos; un gran volumen de distribución y una prolongada fase de eliminación tanto en leche como en sangre. El hecho de que AZI tiende a acumularse en células inflamatorias, ha tenido incidencia cinética en los resultados obtenidos tras su administración, especialmente en la administración intramamaria. Dado su comportamiento farmacocinético estudiado y descripto en este trabajo AZI demostró ser una interesante herramienta potencial para las infecciones de los tejidos blandos el bovino, aunque esto debería ser complementado con estudios de eficacia.

Title: Pharmacokinetic of Azithromycin in Holstein Lactating Cows**Key Words:** *Azithromycin, Bovine mastitis, Pharmacokinetic***Summary:**

The prototype of the macrolide class of antibiotics was introduced in 1952 under the name of Erythromycin. Azithromycin (AZI) is a semisynthetic compound in which the lactone ring has been expanded to a 15-member structure and is considered the prototype of new macrolide structures identified as azalides. In human medicine, azithromycin has an improved pharmacokinetic profile, shows an expanded/enhanced antimicrobial spectrum over erythromycin, and the incidence of gastrointestinal-related effects are significantly lower, providing a useful alternative to erythromycin. In veterinary medicine AZI could possess advantages for the treatment of certain bovine infections such as those produced in the mammary gland. The objective of this paper was to study its pharmacokinetic behavior in blood and milk following administration by different routes, both in healthy cows and with mastitis. The blood and milk concentrations were determined by the microbiological method and analyzed using a non-compartmental pharmacokinetic descriptive model. The results observed after its administration by any of the analyzed routes was typical of the macrolides, with low plasma concentrations and very high maximum concentrations (C_{max}) in milk and soft tissues; a great volume of distribution and a prolonged terminal half-life both in blood and milk. The fact that AZI tends to accumulate in inflammatory cells, has a kinetic incidence in the results, especially after intramammary administration. Due to the described pharmacokinetic behavior, AZI proved to be an interesting tool with a potential for infections in the soft tissues of the cow, although this should be backed by efficacy trials.

II. INTRODUCCION

II.1 FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA

II.1.1. Mastitis bovina y consideraciones generales sobre terapia antimicrobiana

La leche es el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada. Ha de ser recogida higiénicamente y no debe contener calostro. Esta es la definición adoptada en el Primer Congreso Internacional para la Represión de los Fraudes en los Alimentos, que tuvo lugar en Ginebra en 1908 (1). La Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) en el año 1983 define a la leche como: El producto de la secreción normal de la mama, obtenido por uno o varios ordeños, sin ninguna adición o substracción.

Pero no necesitamos una definición de leche para darnos cuenta de su importancia y utilización en la naturaleza. La leche es el único alimento de los mamíferos recién nacidos, absolutamente indispensable para asegurar su supervivencia y crecimiento. La madre nutre a su descendencia gracias a la secreción láctea producida por sus glándulas mamarias. La lactación del joven cesa, después de una duración variable, según las especies, con el destete.

En el caso de la mujer, la lactación natural es probablemente el mejor sistema de alimentación, tanto en el plano afectivo como en el nutritivo, pero, por diversas razones, en lugar de la lactancia directa, a veces es necesario apelar imperativamente a la utilización de productos lácteos industriales, adaptados al crecimiento del niño de pecho (2).

El hombre busca también en la leche y sus derivados, productos agradables a su gusto, que además, le proporcionen una buena parte de su suministro alimenticio a lo largo de su vida. Es por esto por lo que el hombre ha recurrido a la leche de la vaca, y ha puesto en marcha una industria de transformación láctea. En esta industria la materia prima es la leche, por lo que esta debe ser de máxima calidad.

La leche está constituida por una fase acuosa (suero) y una fase sólida, a su vez formada por azúcares (lactosa), lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres), proteínas (caseína, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, albúmina sérica e inmunoglobulinas), vitaminas y minerales.

El hombre a través de la selección genética y los avances en la tecnología de ordeño, ha llevado a que la ubre de la vaca lechera actual, produzca cantidades de leche muy superiores a aquellas para las que la glándula "original" había sido diseñada. Este hecho, agregado a la remoción mecánica de la leche, indudablemente impone situaciones de "stress" que pueden tener gran impacto sobre la salud de la glándula, la producción de la leche y su composición (3).

En las vacas lecheras el período de lactación se prolonga artificialmente. La mayoría de estas vacas son vueltas a servir seis semanas más tarde y, por ende, están preñadas durante la mayor parte del período de lactación. El ordeño se interrumpe unos dos meses antes del nacimiento del ternero siguiente y la vaca “se seca”. La involución parcial que ocurre entonces no tarda en cesar y la ubre vuelve a agrandarse poco antes de que nazca el ternero siguiente. En consecuencia, las vacas lecheras que conciben después de la primera inseminación lactan durante unos diez meses y están secas unos dos meses cada año. Una buena vaca lechera produce de 7000 a 9000 litros en el curso de una lactación, cantidad que es mucho mayor que la requerida para alimentar a un ternero.

La afección más frecuente y peligrosa que puede sufrir una vaca lechera es la mastitis. El término mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria, sea cual fuere su causa (4). Esta patología tiene lugar fundamentalmente, en los comienzos de la lactancia y cursa con alteraciones de diferente tipo e intensidad en la producción láctea. En algunos casos como manifestación local de diferentes enfermedades infecciosas generales y en otros, como estados infecciosos propios de la glándula, que pueden ser contagiosos o no y producidos por diferentes gérmenes patógenos (5).

Como agentes causales figuran principalmente bacterias, correspondiendo a los micoplasmas y hongos una importancia secundaria. Los gérmenes penetran en la mama ya sea siguiendo el canal del pezón, la cisterna y los conductos galactóforos (infección galactógena), o a través de heridas de la piel y pezones (infección de heridas, infección linfógena) o bien arrastrados por el torrente sanguíneo (infección hematógena) (4).

La mastitis puede ser clasificada por el tiempo de evolución en aguda o crónica; por la zona invadida puede ser focal o zonal (uno o dos cuartos) y difusa o general (toda la ubre); por la forma de presentación puede ser: exudativa, serosa, fibrinosa, purulenta, hemorrágica, gangrenosa, etc.; y finalmente, según la causa que la determina: infecciosa o traumática (5, 6).

Hay una forma subclínica de mastitis, que económicamente es la más importante (7). Las enfermedades subclínicas de la ubre se caracterizan por su naturaleza inaparente, donde por lo general no podemos distinguir exteriormente signos de enfermedad en la vaca afectada. La vaca parece normal en su comportamiento, la ubre se ve normal y la leche que se ordeña también parece normal. Los principales gérmenes causantes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (5).

Aunque el plan de lucha contra la mastitis debe basarse en la prevención del contagio de vacas sanas, la curación de las vacas infectadas tiene importancia en el control

de la enfermedad y por intermedio del tratamiento antibiótico se pueden eliminar infecciones causadas por diversos gérmenes.

Pero para aprovechar en su totalidad el potencial del tratamiento, este debe ser adecuado al tipo de infección y debe recordarse que el tratamiento es solamente uno de los eslabones en la larga cadena de control de la mastitis. No debemos olvidar que un mal manejo terapéutico repercute negativamente en salud pública; debido a la presencia de residuos de medicamentos que pueden desencadenar problemas de diversa índole como por ejemplo procesos alérgicos, aparición de cepas resistentes, fracaso terapéutico, etc.

Otra consecuencia del uso inadecuado de antibióticos es la presencia de residuos en la industrialización de los productos lácteos con la consecuente pérdida económica (5, 8).

La terapia con antibióticos ha sido y continúa siendo la más adecuada en el tratamiento de la mastitis. Ante la instauración de una terapia con antibióticos se debería: elegir la droga a la cual el microorganismo es susceptible, fijar dosis y duración de tratamiento en base a las características cinéticas del medicamento. Y finalmente, cumplir rigurosamente con los períodos de retirada (9).

Pese a las décadas de investigación y planes integrales de control, la mastitis bovina continúa siendo un problema para la industria lechera de todo el mundo, debido a las pérdidas económicas ocurridas a nivel de la granja lechera, como aquellas debidas a menor producción de los cuartos infectados, descarte de leche, costos de tratamientos y refugio prematuro de animales de alto mérito genético; pero fundamentalmente por los efectos adversos sobre la calidad de la leche cruda y los productos elaborados con ella (10).

Seleccionamos estos animales, los mejoramos y los explotamos. Pero no olvidemos que para obtener un producto animal de buena calidad, debemos brindarles a ellos, un estado de salud pleno. Para lo cual además de estrategias de prevención debemos aplicar terapias adecuadas en aquellos animales que así lo necesiten, siendo de suma importancia para ello un conocimiento exhaustivo de las características anatómicas y fisiológicas del órgano blanco, sus procesos patológicos y una comprensión de la terapéutica más apropiada, incluyendo en este campo el conocimiento del comportamiento farmacocinético del agente antimicrobiano seleccionado.

Cuando se decide tratar una mastitis, el tratamiento debe ser integral y completo. Para lo cual es fundamental realizar un buen diagnóstico, evaluando cuidadosamente la susceptibilidad bacteriana y eligiendo el agente o la combinación de los mismos que se utilizará. Considerar especialmente el terreno mamario y las posibilidades de penetración del producto elegido, no solamente en la glándula mamaria, sino en polimorfonucleares y aún

más, en fagolisosomas. El plan de administración es muy importante, éste nos permite obtener el “tiempo de contacto” ideal para el medicamento y el microorganismo de que se trate. Se debe poner especial atención al respeto meticuloso de los períodos de descarte de la leche. Esto nos permitirá enviar al mercado leche con presencia de **fármacos** por debajo de los máximos niveles residuales permitidos (9).

Los antibióticos pueden ser administrados por dos vías: la vía intramamaria, que es aceptada como de elección en el tratamiento de mastitis subclínicas o crónicas, y que en el caso de mastitis agudas, eventualmente fracasa debido a la pobre y despareja distribución del medicamento a través del intenso crecimiento del parénquima mamario, o por el bloqueo que producen los productos inflamatorios. En estas circunstancias, algunos autores recomiendan la terapia parenteral (11, 12). El éxito de la terapia parenteral depende del pasaje de las drogas desde la sangre a la leche (5), por lo que las características fisicoquímicas del agente seleccionado son tan importantes como las microbiológicas.

II.1.1.1. Tratamiento parenteral

Para un tratamiento eficaz, se debe escoger un antibiótico que responda a cuatro condiciones:

- 1) Ser activo sobre los gérmenes responsables de la mastitis.
- 2) Difundir bien en el organismo sin ser atrapado por otro órgano que no sea la glándula mamaria.
- 3) Pasar la barrera fisiológica de la ubre (barrera sangre-leche).
- 4) Mantenerse en la leche y en el tejido mamario en forma activa y según el antimicrobiano lograr las relaciones PK/PD adecuadas (C_{max}/CIM , AUC/CIM , $T > CIM$ para eliminar los microorganismos patógenos sin permitir la emergencia de bacterias resistentes.

La mayoría de los antibióticos atraviesan la barrera sangre-leche por difusión pasiva, la barrera (epitelio mamario) hace las veces de límite lipoideo-poroso que separa la sangre con un pH 7.4, de la leche que tiene un pH con un valor algo inferior (6,5 a 6,8) en condiciones normales (5, 13). Los medicamentos penetran esta barrera por difusión a través de los lípidos de la membrana o pasando a través de los poros acuosos; este pasaje está determinado por la intensidad de la unión del antibiótico a la albúmina plasmática, por el pKa y por su grado de solubilidad en lípidos (12). La mayoría de los antibióticos usados en el tratamiento de la mastitis son ácidos o bases orgánicas débiles. La fracción no ionizada es más liposoluble que la ionizada y puede difundir más fácilmente a través de las membranas (14, 15).

La proporción de droga en forma no ionizada depende del logaritmo de la constante de disociación (pKa) de la droga y del pH del medio en el cual está disuelta.

La relación entre la concentración teórica del antibiótico en sangre y leche puede ser calculada según la ecuación de Jacobs. Para el caso de las bases débiles, que no están ionizadas en sangre la relación leche : suero =

$$R_{\text{leche/ sangre}} = \frac{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH leche})}}{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH suero})}}$$

Donde esta relación es superior o igual a 1 (15-16-17)

En cambio para los ácidos débiles la relación será:

$$R_{\text{leche/ sangre}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH leche} - \text{pKa})}}{1 + 10^{(\text{pH suero} - \text{pKa})}}$$

Cuyo valor es inferior o igual a 1

Los antibióticos anfóteros, como las tetraciclinas y los que no se ionizan, como el cloranfenicol, altamente lipófilicos, producen relaciones leche/suero de 1 o valores ligeramente menores, tanto en leches normales como en mastíticas porque el grado de ionización de estas drogas no sufre cambios por las pequeñas diferencias de pH (5, 16).

Se ha demostrado que solamente difunde a la leche la fracción no ionizada y liposoluble de un electrólito orgánico presente en la fase acuosa del plasma sanguíneo (17, 18).

La duración de la excreción de un antibiótico en la leche se puede definir como el plazo que transcurre entre el tratamiento y el momento en el cual la concentración de residuos en la leche no puede ser dosada, aunque esto último depende de la sensibilidad del método de detección. Esta duración de excreción se expresa en horas (5, 19).

Existen cálculos farmacocinéticos bastante precisos que permiten estimar los parámetros farmacocinéticos de antibióticos en la leche, en función de la dosis y de las características químicas del medicamento (5, 12).

Hay tres parámetros principales a tener en cuenta:

1) La relación R de concentraciones máximas medidas en el suero y en la leche:

$$R = \frac{\text{Cmáx suero}}{\text{Cmáx leche}}$$

Que para el caso de los macrólidos suele ser de 1, tanto en la leche normal como en la infectada.

2) El porcentaje de la dosis encontrada en la leche: esta fracción es de 0.1 para el cloranfenicol, también tanto en la leche sana como en la enferma.

3) La biodisponibilidad láctea (FLac): es la relación entre las áreas bajo las curvas (AUC) concentración vs tiempo medidas en suero y en leche. Este parámetro permite comparar la cantidad total de antibiótico que aparece en la leche y en el suero durante el tratamiento. Esta cantidad se calcula midiendo las AUC y permite apreciar la importancia del pasaje de antibióticos a la leche, y en el caso del cloranfenicol sería 2 en la ubre sana y en la enferma, mientras que para la penicilina G es de 20 en la ubre normal y 5 en la infectada y para la cloxacilina, 15 y 55 respectivamente (5). En el caso de los macrólidos, por su parte, las concentraciones suelen ser mas bajas en la leche del animal mastítico que en la del sano.

Hay una serie de factores que influyen en la excreción de antibióticos por la leche tras su administración parenteral. Algunos de ellos serían: dosis administrada (20), el excipiente empleado (20), número de tratamientos efectuados (21) y el estado patológico de la glándula. En el caso de algunos antibióticos (penicilinas, aminoglucósidos y macrólidos) la presencia de una infección mamaria parece perturbar considerablemente la eliminación de los antibióticos por la leche luego de la administración intramuscular (5).

Por ejemplo, el pasaje de aminoglucósidos a la leche aumenta en caso de mastitis mientras que en el caso de los macrólidos, disminuye. La eliminación de cloranfenicol y de tetraciclinas no parece ser afectada por la infección mamaria.

II.1.1.2. Tratamiento intramamario

La utilización de antibióticos por vía intramamaria, es particularmente importante en medicina veterinaria, por una parte, en función de tratarse del método más difundido para el tratamiento de la mastitis y por otra parte, por sus connotaciones higiénicas debido a la

permanencia de residuos de antibióticos en la leche. Hay dos puntos vitales a tener en cuenta ante la elección de drogas: la eficacia del tratamiento y las consecuencias desde el punto de vista de la salud pública (5, 22).

La excreción de antibióticos desde la leche está gobernada por la cantidad de leche producida, las características del medicamento y el estado de salud de la ubre (5, 23). Algunos antibióticos persisten en la leche más allá de 96 horas después de la administración. Se soluciona este problema usando bases que permitan la rápida excreción del antibiótico, pero a altas dosis y a intervalos más frecuentes de tratamiento para compensar el corto período de acción (23).

La ubre bovina es un órgano poco favorable para realizar estudios cinéticos de drogas (12). El procedimiento más común es medir la velocidad de excreción de las drogas en leche y el porcentaje de droga encontrado en la misma. Por cierto que hay que considerar una serie de factores, uno de los más importantes son los ordeños, que representan el vaciado de la ubre 2 a 3 veces por día.

II.1.1.3.-Barrera sangre-leche

La transferencia de ácidos y bases débiles a través de la barrera sangre/leche tiene lugar por un proceso de difusión pasiva de las fracciones no ligadas y no ionizadas de la droga; esto está influenciado por el pH del medio y el pK_a de la droga.

Las diferencias en las concentraciones de droga entre sangre y leche se deben fundamentalmente a las diferencias de pH que hay entre estos dos fluidos (pH de la leche 6.6 - 6.8 y pH del plasma 7.4 -7.7) el grado de ionización de la droga y la disponibilidad de droga para atravesar la barrera lipídica en el orden que establece el equilibrio a través de la membrana.

En consecuencia las bases débiles tienden a acumularse en leche, en tanto que las concentraciones de sustancias ácidas tienden a ser más bajas que en plasma debido a que estas se encuentran en mayor grado **en forma no ionizada** (24).

II.1.1.4.- Excreción biliar

Los fármacos y sus metabolitos también pueden ser excretados pasiva o activamente por los hepatocitos hacia los canalículos biliares y finalmente hacia el duodeno por bilis. Si las propiedades de estos compuestos son favorables para la absorción intestinal se reabsorberán pudiéndose establecer un ciclo enterohepático.

Durante tal ciclo continúan la secreción biliar y la reabsorción intestinal hasta que la degradación metabólica o excreción urinaria finalmente cause la eliminación del

agente del organismo. Los ciclos enterohepáticos a menudo son responsables de las vidas medias prolongadas observadas en fármacos excretados principalmente en la bilis.

El papel principal de la vía biliar de excreción consiste en eliminar ciertos iones orgánicos que no pueden reabsorberse desde el aparato intestinal, ya que están ionizados con el pH prevalente. En los hepatocitos están situados sistemas de transporte mediados por portadores no específicos para ácidos y para bases. Los fármacos con masas moleculares menores de unos 300 Daltons por lo general se difunden pasivamente hacia la bilis (25).

II.I.I.5.- Excreción salival y mamaria

La excreción de fármacos a través de las glándulas mamarias y salivales ocurre por difusión pasiva o iónica. El proceso es determinado por las relaciones pH / pK_a , solubilidad en lípidos y gradientes de concentración. La saliva y sudor por lo general tienen menos importancia. La vía salival de excreción es importante sólo en los rumiantes, ya que secretan cantidades muy voluminosas de saliva alcalina. La determinación de concentraciones de droga en saliva es un excelente indicador de droga libre en plasma, utilizado en monitorización de medicamentos.

La excreción de fármacos a través de leche tiene una gran importancia en medicina veterinaria, ya que puede afectar a las crías lactantes, teniendo particular importancia en salud pública, por lo que debe ser contemplada esa posibilidad al administrar un fármaco a vacas lecheras (26). En el caso particular de las avermectinas, por ejemplo, sus concentraciones en leche pueden ejercer efecto antiparasitario contra parásitos muy susceptibles en el animal lactante

II.1. 2. Azitromicina

Hace exactamente cien años -1910- Paul Erlich define a la quimioterapia como una rama de la farmacología que se ocupa del estudio de las sustancias de composición química definida, que introducidas en el organismo, son capaces de lesionar o destruir específicamente los agentes patógenos vivos, sin presentar efectos tóxicos acentuados sobre el huésped.

En el año 1928, Alexander Fleming demostró la producción de sustancias antibióticas por un moho, a partir de observaciones realizadas en cultivos de estafilococos contaminados con *Penicillium notatum*.

Fleming no fue capaz de aislar la penicilina en forma pura, pero Raistrick ampliando los experimentos de Fleming descubre en el año 1930 que la penicilina es un ácido orgánico que puede extraerse de un cultivo acidificado, mediante éter (27).

En 1936 se inició la era moderna de la quimioterapia con la utilización clínica de la sulfonamida; y la “edad de oro” del tratamiento antimicrobiano, comienza en el año 1941, cuando Florey y sus colaboradores aislaron la penicilina en forma de polvo impuro y de color pardo. A partir de aquí comienza la producción de penicilina en forma masiva y su utilización en ensayos clínicos.

Desde entonces la historia de los agentes antimicrobianos ha sido muy dinámica con un avance progresivo en investigación y en la industria farmacéutica proporcionando cada año nuevas moléculas que contribuyen a incrementar el arsenal terapéutico.

Azitromicina (AZI) es un nuevo macrólido ácido estable, semisintético, obtenido a partir de eritromicina. Se diferencia de esta última por ser mejor tolerado tras la administración oral, presentar un espectro antimicrobiano más amplio y mejores características farmacocinéticas como penetración tisular (28). Es el prototipo de una nueva sub-clase de antibióticos macrólidos con una estructura anular de 15 miembros, conocidos como AZALIDOS (29, 30). Difiere de la eritromicina (Figura 1) por la inserción, de un átomo de nitrógeno asociado a un grupo metilo en la posición 9ª del anillo lactónico (31), dando lugar a la siguiente formula molecular $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, cuyo peso molecular es de 749.00, esta diferencia se puede apreciar claramente en la Figura 1.

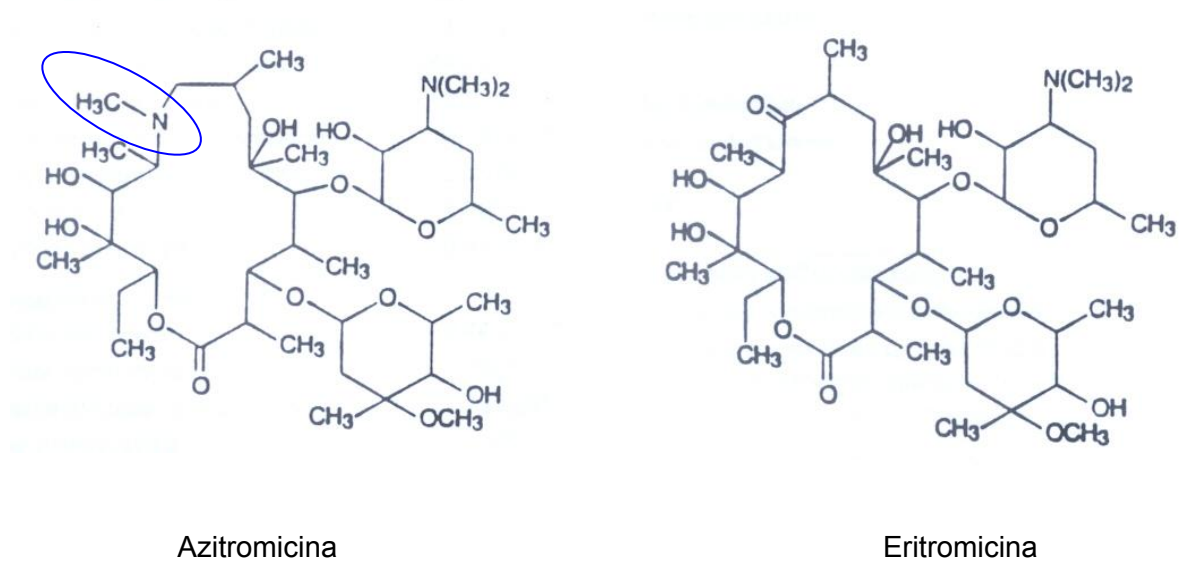


Fig. 1. Estructura química de Azitromicina y Eritromicina

Estudios in vitro muestran a la azitromicina como levemente menos activa que eritromicina frente a organismos Gram-positivos aunque esto es de dudosa significancia clínica ya que alcanza concentraciones tisulares mayores. Por el contrario, se reconoce a azitromicina más activa contra muchos patógenos Gram-negativos como *Haemophilus influenzae*, *H parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y *Borrelia burgdorferi*. Al igual que la eritromicina y otros macrólidos, la actividad de la azitromicina no es afectada por las β -lactamasas (31, 32).

Luego de su administración oral, se observan concentraciones séricas más bajas que para eritromicina, esto es ocasionado por su rápida distribución desde la circulación sistémica hacia compartimentos extravasculares, dando como resultado concentraciones tisulares varias veces superiores a las comúnmente alcanzadas por eritromicina (33); posteriormente sufre una lenta liberación desde el compartimiento extravasculares y, en gran medida, intracelulares. Lo cual se ve reflejado en una prolongada fase de eliminación (32).

Estas características cinéticas ofrecen notables ventajas en los regímenes de dosificación, suplantando el tradicional régimen de dosificación utilizado para eritromicina (32). Los esquemas posológicos habituales de Azitromicina oral son de 3 a 5 comprimidos de 500 mg cada 24 horas; y recientemente se han desarrollado formulaciones de liberación

lenta –microesferas- que permiten realizar tratamientos equivalentes con una sola dosis (34).

La eficacia clínica de la azitromicina ha sido confirmada en tratamientos de infecciones del tracto respiratorio alto y bajo, piel y tejidos blandos (35).

Pruebas clínicas comparativas han demostrado que azitromicina es mejor tolerada que eritromicina, sobre todo en lo que respecta a trastornos gastrointestinales. Estos estudios también han demostrado un perfil de tolerabilidad superior a cefaclor, doxiciclina o amoxicilina-probenecid (32).

II.1.2.1. Actividad antimicrobiana

Azitromicina presenta un espectro de actividad in vitro similar al de eritromicina aunque con algunas diferencias frente a determinados microorganismos.

Azitromicina es activa contra aislamientos de *Staphylococcus aureus*, incluso productores de β -lactamasas, aunque menos que claritromicina y roxitromicina, también es activa frente a *Staphylococcus epidermidis* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativos. Sin embargo *Staphylococcus* resistentes a los macrólidos, también lo son a azitromicina (32).

Presenta buena actividad frente a *Streptococcus grupo A, B, C, F, G*; otros *Streptococcus* orales y *Streptococcus bovis*, como así también frente a microorganismos patógenos comúnmente aislados del tracto urogenital como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealiticum* y patógenos atípicos del tracto respiratorio como *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (35).

Se comporta como bactericida frente a una variedad de microorganismos incluidos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, especies de *Bordetella*, *Legionella pneumophila*, *M. catarrhalis*, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, complejo de *M. avium* y *Borrelia burgdorferi* (36).

Es inactiva contra Enterococos grupo D y activa contra *Streptococcus pneumoniae* sensible a eritromicina. *Listeria monocitogenes* es moderadamente sensible a azitromicina y las especies de corinebacterias son generalmente resistentes. Ha demostrado una actividad moderada contra especies de clostridios (32).

Azitromicina ha demostrado su actividad antimicrobiana en modelos animales con infecciones experimentales producidas por diferentes microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (incluidos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *H. Influenzae*, *L. pneumofila*) y otros microorganismos como *T. gondii*, *T. pallidum*, *B. burgdorferi*, *C. trachomatis* y complejo de *M. Avium* (32).

Azitromicina aparentemente tiene un efecto parasitostático *contra Toxoplasma gondii* por lo que suele ser utilizada en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (37). También se ha evaluado la actividad antimalárica de azitromicina en infecciones experimentales en ratones infectados con *Plasmodium yoelii nigeriensis*, obteniéndose resultados de curación satisfactoria (38). Aun continúan las investigaciones sobre el uso potencial de azitromicina en el tratamiento de la malaria, tracoma, infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, erytema migrans, fiebre tifoidea, criptosporidiosis, enfermedad pélvica inflamatoria, acné, fiebre purpúrea del mediterráneo (mediterranean spotted fever) y complejo micobacterium aviar (MAC) (39). Administraciones de Azitromicina con atovaquona han resultados eficaces para el tratamiento de babesiosis en humanos (40). También la combinación con Ivermectina y Albendazol para el tratamiento del tracoma (41)

El efecto postantibiótico, definido como la supresión persistente del crecimiento bacteriano luego de la exposición a un antimicrobiano in vitro por un período corto de tiempo (42), documentado para azitromicina es de aproximadamente 3.5 horas contra *S. Pyogenes* y *S. pneumoniae*, 3 horas para *M. catarrhalis*, 2 horas para *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* y 1.7 horas para *H. Influenzae* a cuatro veces su concentración inhibitoria mínima CIM (43).

El efecto antibacteriano de azitromicina al igual que otros macrólidos, es atribuido a su unión reversible con la subunidad ribosomal 50 S de la célula bacteriana, con la subsecuente inhibición de la síntesis proteica; el efecto bacteriostático o bactericida depende de la sensibilidad del microorganismo y de las concentraciones de azitromicina alcanzadas en el tejido infectado (44). La presencia del grupo metilo en la posición 9 del anillo macrólido, confiere una carga positiva extra a la molécula de azitromicina; esta carga extra amplía el espectro bacteriano de azitromicina en relación a la eritromicina contra la mayoría de los organismos gram-negativos. (28)

II.1.2.2. Farmacocinética farmacodinamia

Azitromicina es considerada más estable que eritromicina en medios ácidos, esto se logró por la incorporación del átomo de nitrógeno en la posición 9 del anillo lactónico, debido a que provee de un segundo sitio de protonación. Esta modificación química además de mejorar su estabilidad en ambientes ácidos, mejora su absorción a nivel del tubo digestivo y disminuye de esta manera los trastornos gastrointestinales (45, 46, 31). Tras su administración oral en el hombre, presenta una biodisponibilidad de alrededor del 37 %, superior a la obtenida para eritromicina luego de su administración por la misma vía (25 %) (47).

Los antibióticos macrólidos -casi todos de gran peso molecular- son sustratos para el transporte a través de transportadores como la P-glicoproteína y de ahí su escasa absorción oral; sin embargo Azitromicina y otros macrólidos como Claritromicina exhiben una **mayor excelente** biodisponibilidad por la vía oral, debido a su afinidad química por otros transportadores como los OATPs (organic anion transporting polypeptides) (48).

El perfil farmacocinético está caracterizado por una rápida y extensiva captación desde la circulación hacia compartimientos intracelulares, seguida de una lenta fase de eliminación (32).

Quizás esto explique el bajo pico de concentración plasmática alcanzado (C_{max}) de alrededor de 0.4mg/L a las 2.5 horas de una administración oral de 500 mg (49) en el hombre.

Esta molécula, aparentemente, presenta una amplia distribución en el organismo. Generalmente se observan elevadas concentraciones en tejidos y órganos como pulmón, tonsilas, próstata, hígado y linfonódulos; fluidos tisulares y una variedad de tipos celulares, incluidos fagocitos de la sangre. Estudios farmacocinéticos en humanos mencionan volúmenes de distribución de el orden de los 23 a 30 L/Kg (50). Mientras que las concentraciones encontradas en grasa y músculo son relativamente bajas (51, 52, 53). Algunos autores mencionan que al igual que eritromicina y roxitromicina, posee pobre capacidad para atravesar la barrera placentaria, por lo que su eficacia en el tratamiento de infecciones fetales es limitada (54). Mientras que estudios más recientes describen que luego de la administración oral de 1 gramo de Azitromicina en mujeres embarazadas, se obtienen altas concentraciones en miometrio, tejido adiposo y placenta; en líquido amniótico si bien las concentraciones obtenidas también son altas, declinan a partir de las 6 horas (55).

La fijación a las proteínas plasmáticas es del 50 % a concentraciones de 0.002 a 0.05 mg/L y se reduce a un 7 % a concentraciones de 1 mg/L. Esta afinidad proteica es inferior a la que presenta la eritromicina (72 % a 0.4 mg/L) o roxitromicina (96 % a 2.5 mg /L). Lo que sugiere que elevadas concentraciones de azitromicina se encuentran en la forma libre, disponibles para distribuirse en los sitios de infección (32). Lo anteriormente mencionado fue demostrado mediante un modelo animal de infección experimental (Infección con *H. Influenzae* en ratón), encontrándose altas concentraciones en el parénquima pulmonar de los animales enfermos (12 mg/kg) con respecto al grupo control que recibió la misma dosis de 50 mg/kg. Estos resultados se deben a las altas concentraciones intracelulares alcanzadas en leucocitos polimorfonucleares y a la lenta liberación desde el sitio de infección pulmonar (56).

La acumulación de droga intracelular esta influenciada por la concentración extracelular del antibiótico, viabilidad de las células, el calcio extracelular, temperatura y pH (57). La difusión pasiva es el mecanismo principal de transporte a través de membrana fagocítica y el transporte activo en menor importancia (58). El ingreso de droga a la célula no es afectada por inhibidores del metabolismo celular, aunque puede verse levemente afectada por la fagocitosis. La excreción desde la célula se realiza en forma muy lenta y puede incrementarse marcadamente por agentes que puedan neutralizar el pH lisosomal que previene la protonación y prolonga la retención dentro de la célula (58).

Azitromicina es excretada de manera inalterada principalmente con las heces vía biliar y secreción transintestinal, y en menor grado por la orina (6 % luego de 24 horas de la administración oral y 12% a los tres días de la aplicación intravenosa) (47, 59). La excreción transintestinal quizás sea el mecanismo primario de eliminación de los componentes inalterados. La eliminación de azitromicina desde el suero siguiendo un diseño polifásico, se refleja inicialmente con una rápida distribución hacia los tejidos y la subsecuente liberación lenta desde los mismos (32).

El perfil farmacocinético no es alterado en forma significativa en pacientes ancianos con un leve deterioro renal, ni tampoco en pacientes con un moderado deterioro hepático. No hay datos farmacocinéticos en pediatría, pero pacientes con distintos grados de insuficiencia renal no presentaron diferencias significativas en parámetros farmacocinéticos como área bajo la curva (AUC), o volumen de distribución (Vd) (60).

En cuanto a las interacciones medicamentosas eritromicina posee complejas maneras de interacción cuando es administrada con glucocorticoides, carbamazepina y teofilina, incrementando los efectos producidos por estos. Esto se debe a que eritromicina inhibe a la isoenzima P del citocromo P-450. Sin embargo azitromicina no produjo inhibición o inducción del citocromo P-450 en estudios realizados en ratas; y sobre un estudio retrospectivo realizado sobre 3995 pacientes no reveló interacción alguna en los casos que recibían concomitantemente teofilina, warfarina, cimetidina, carbamazepina o metil prednisolona (32). La combinación con Ivermectina y Albendazol para el tratamiento del tracoma puede incrementar el AUC y la Cmax en un 31% y 27% respectivamente para Ivermectina y disminuir los mismos parámetros 16% y 14% para sulfóxido de albendazol (41).

En virtud de estos resultados, en los casos en los cuales es necesario tratar un paciente con más de un medicamento incluido un antibiótico macrólido, azitromicina es la droga de elección por su baja interacción droga-droga (61)

Desde el punto de vista farmacodinámico, los macrólidos tienen la particularidad de no pertenecer a una sola categoría (62). Se considera que su actividad bacteriológica es tiempo-dependiente y que el éxito terapéutico está estrechamente ligado al parámetro $T > CIM$ (62, 63). Sin embargo, azitromicina tiene un perfil PK particular y a diferencia de los macrólidos tradicionales, posee un marcado EPA in vivo (62). Estudios experimentales han demostrado que para alcanzar la eficacia clínica de azitromicina y claritromicina, se debe tener en cuenta tanto el $T > CIM$ como el ABC_{0-24h}/CIM (62, 64, 65, 66). Incluso, algunos autores han postulado que, azitromicina y claritromicina, tienen una actividad bacteriológica concentración-dependiente y que el parámetro $C_{máx}/CIM$ es el que mejor predice su comportamiento (66).

II.1.2.3. Toxicidad

Los efectos adversos observados luego de la administración de azitromicina fueron similares a otros agentes comparables con esta droga como penicilinas, cefalosporinas y otros macrólidos. Sin embargo son considerados escasos en comparación con los reportados para otros agentes antibacterianos como eritromicina, cefaclor y la combinación amoxicilina/probenecid (32). Los más comunes pueden ser: disturbios gastrointestinales (9.6 %) seguidos de efectos en el sistema nervioso central y periférico (28). Pero normalmente los efectos adversos van de leves a moderados y solamente son graves en un 6 % de los casos, predominando los trastornos gastrointestinales, vértigo, cefaleas, fatiga y efectos cutáneos. Sobre un estudio con 3995 pacientes tratados con azitromicina solo en un 0.7 % de los pacientes tuvo que ser suspendido el tratamiento, en comparación con 1.3 a 15.2 % para otras drogas en estudio (32).

En conclusión azitromicina es un antibiótico de amplio espectro y probada eficacia en un importante rango de infecciones comunes adquiridas. Presenta un muy buen perfil farmacocinético y de tolerabilidad, con un apropiado régimen de dosificación, dando una alternativa útil para eritromicina y otros macrólidos con similar actividad

II.2. HIPOTESIS

- 1- Azitromicina –al igual que la mayoría de los macrólidos- es una molécula que posee un gran volumen de distribución con una buena penetración en la glándula mamaria, alcanzando altas concentraciones en leche.
- 2- Normalmente azitromicina se elimina principalmente por vía biliar y en menor grado por orina, pero en animales en lactación la secreción láctea es una vía de eliminación importante.
- 3- Azitromicina se distribuye ampliamente hacia tejidos y fluidos biológicos.
- 4- Las concentraciones de azitromicina en leche son mas elevadas en animales sanos que en animales mastiticos en función de los cambios en el pH de la leche.
- 5- Luego de la administración intramamaria de azitromicina, esta droga atraviesa la barrera sangre leche encontrándose también en suero.

II.3. OBJETIVOS

II.3.1 objetivos generales

- 1- Definir el comportamiento farmacocinético de azitromicina en vacas lecheras Holando Argentino sanas y con mastitis.
- 2- Establecer una aproximación al régimen terapéutico óptimo para azitromicina en vacas lecheras.

II.3.2. Objetivos específicos

- 1- Poner a punto la técnica de detección y cuantificación de azitromicina por método biológico.
- 2- Estudiar la disposición sérica y láctea de azitromicina en vacas lecheras sanas y con mastitis, tras la administración intravenosa.
- 3- Estudiar la disposición sérica y láctea de azitromicina en vacas lecheras sanas y con mastitis, tras la administración intramuscular.
- 4- Estudiar la disposición sérica y láctea de azitromicina en vacas lecheras sanas y con mastitis, tras la administración intramamaria.
- 5- Comparar la disposición láctea de azitromicina en vacas sanas y con mastitis.
- 6- Estudiar la disposición de azitromicina en tejidos y fluidos tisulares tras su administración intramuscular en terneros.

III. MATERIALES

III.1. FORMULACION EXPERIMENTAL

Se prepararon cuatro formulaciones experimentales de azitromicina; Intravenosa, Intramuscular, IMM lactación e IMM secado. Cada una de estas con las adaptaciones necesarias para su aplicación y vía de administración.

La formulación estuvo a cargo del área galénica del departamento de Investigación y desarrollo del laboratorio Biogénesis Bagó por contar con la experiencia, equipamiento e instalaciones para la elaboración de lotes experimentales.

Con cada lote preparado y en cualquiera de sus formas farmacéuticas, el laboratorio controló el título de azitromicina por HPLC, tanto en la formulación granel como en el envase definitivo. Además de otros parámetros como pH, esterilidad y pirógenos.

III.1.1. Formulación Endovenosa

Frascos de 50 y 500 mL conteniendo una solución de azitromicina citrato al 10% P/V equivalente a 10 mg/mL.

La solución endovenosa fue formulada en una matriz 100% acuosa

III.1. 2. Formulación Intramuscular

Frascos de 50 y 500 mL conteniendo una solución de azitromicina base al 10% P/V equivalente a 10 mg/mL.

La solución intramuscular fue formulada en una matriz de Propilenglicol 80% alcohol bencílico 20%.

III.1.3. Formulación Intramamaria para tratamiento de vaca en lactación

Jeringas intramamarias con un volumen total de 10 mL conteniendo 125 mg de azitromicina base en partes iguales de Polietilenglicol 400 (PEG 400) y Polietilenglicol 1000 (PEG 1000)

III.1.4. .Formulación Intramamaria para tratamiento de la vaca al momento del secado.

Jeringas intramamarias con un volumen total de 10 mL conteniendo 250 mg de azitromicina base en partes iguales de Polietilenglicol 400 (PEG 400) y Polietilenglicol 1000 (PEG 1000)

III.2. ANIMALES EXPERIMENTALES

III.2.1 Grupos experimentales

Los animales de experimentación fueron obtenidos de diferentes establecimientos lecheros de la provincia de Buenos Aires, "Ojo de Agua" situado en el partido de Tandil; "El Recreo" ubicado en el partido de Brandsen y "El Placer" de Bavio partido de La Plata.

Se formaron cuatro grupos de 12 vacas HA cada uno para realizar los estudios farmacocinéticos, los cuales estuvieron formados por animales sanos y animales con mastitis subclínica (seis sanos y seis con mastitis subclínica)

-Grupo uno correspondiente al tratamiento endovenoso

-Grupo dos correspondiente al tratamiento intramuscular

-Grupo tres correspondiente al tratamiento intramamario de vacas en lactación

-Grupo cuatro correspondiente al tratamiento intramamario de vacas al momento de secado

Además se formó un quinto grupo con terneros HA para realizar un estudio anexo de penetración tisular de azitromicina.

III.2.1.1. Criterios para selección animal

Para la selección de los animales se tomaron **criterios generales** aplicables tanto a los grupos de vacas sanas como a los grupos de animales con mastitis subclínica, y criterios específicos para los **grupos con y sin mastitis**

Criterios Generales:

- A. Vacas Holando Argentino jóvenes que estuvieran en lactación, con un promedio de producción Láctea no inferior a los 8 litros diarios
- B. Vacas con régimen de ordeño cada 12 horas
- C. Vacas y terneros que no tuviesen sintomatología clínica de ninguna enfermedad evaluadas con los siguientes parámetros:
 - a. Temperatura corporal
 - b. Frecuencia cardíaca
 - c. Frecuencia respiratoria
 - d. Movimientos ruminales
 - e. Palpación de ganglios inguinal superficial y retromamario

Criterios específicos para la selección de animales con y sin mastitis subclínica:

- f. análisis clínico de la ubre
- g. conteo de células somáticas
- h. análisis bacteriológico de leche

III.2.1.2. Criterios de inclusión

Generales:

- Vacas que estuviesen entre la segunda y cuarta lactación
- Sanos en la inspección general (para los 5 grupos)
- Con los cuatro cuartos mamarios funcionales (en ordeño)
- Sin lesiones en los pezones

Animales sin mastitis:

- Ubre sin signos de dolor y temperatura normal a la palpación
- Conteo de células somáticas inferior a 200.000 células /mL
- Sin aislamiento microbiológico en ningún cuarto mamario

Animales con mastitis:

- Conteo de células somáticas superior a 600.000 células /mL
- Con aislamiento microbiológico en al menos dos de sus cuartos mamarios

III.2.1.3. Criterios de no inclusión

- Animales que se encontraran bajo tratamiento antibiótico o hubieran recibido cualquier tratamiento antibiótico en los últimos 60 días (para los 5 grupos)
- Cuartos descolgados (rotura de ligamento suspensor)
- Vacas con marcadas dificultades de manejo

III.2.1.4. Criterios de exclusión (para los 5 grupos)

- Errores en la dosificación o administración de la formulación experimental
- Reacciones adversas pos administración.
- Animales que hubiesen desarrollado otra patología a durante el período de muestreo
- Animales que hubiesen recibido otro antibiótico durante el período de muestreo

III.3. INSTRUMENTAL Y EQUIPAMIENTO

III.3.1. Instrumental y equipamiento de campo

Planillas para captura de datos

Caravanas numeradas y sin numeración

Pinza para caravanas

Marcador indeleble rojo, verde, azul y negro

Mocheta y maneas

Vacutainer B+D sin aditivos

Agujas para vacutainer 18 G y 21 G

Jeringas descartables de 5, 10, 20 y 60 mL

Agujas descartable 16G, 18G, 20G y 21G

Tubos de ensayo para centrifuga (estériles)

Pipetas Pasteur plásticas descartables de 3 mL (estériles)

Gradillas

Calculadora de mano

Tubos de ensayo con fondo redondeado y tapa a rosca por 10 mL

Frascos plásticos para recolección de muestras biológicas de 50 mL

Cinta de enmascarar de 20 mm

Centrifuga (Presvac, Argentina)

Alcohol

Algodón

Balanza electrónica para grandes animales modelo EziWeigh 1 (Tru Test, Nueva Zelanda)

III.3.2. Instrumental y equipamiento de laboratorio

- Cepas de referencia (*Micrococcus luteus* ATCC 9431)
- Solución fisiológica estéril
- Anza de platino
- Mecheros Bunzen
- Autoclave
- Azitromicina -standard secundario-
- Buffer fosfato N° 1 pH 8.5
- Suero bovino libre de antibióticos
- Leche bovina libre de antibióticos
- Medio ATB N° 1
- Medio de cultivo Mueller-Hinton
- Erlenmeyers graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
- Probetas de vidrio de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
- Matraces aforados de vidrio de 10, 100 y 250 mL (IVA, Argentina)
- Agua destilada
- Termómetro de laboratorio 0-100 °C (IVA, Argentina)
- Placas de vidrio de 25 x 25 cm y 2.5 cm de alto (estériles)
- Tubos de ensayo (estériles)
- Cilindros de acero inoxidable de 10 mm de longitud, 6 mm de diámetro interno y 8 mm de diámetro externo (estériles)
- Pipetas de 0.1 cc, 1 cc, 5cc y 10 cc (estériles)
- Micropipeta de 200 µl
- Pinza anatómica
- Planillas con la ubicación de las muestras en los cilindros
- Diagrama guía de la distribución de los cilindros en la placa
- Balanza de precisión Mettler H80
- Balanza de precisión Sartorius.
- Espectrofotómetro "Spectral 24" (Crudo-Caamaño)
- Baño termostático Vicking modelo Masson
- Estufa de cultivo de 25 a 40 °C modelo SL70C (SanJor, Argentina)
- Vernier
- Calculadora
- Gradillas
- Homogenizador de tejidos ultra Turrax, T25.

- Evaporador concentrador de muestras
- Vortex, para un tubo
- vortex para varios tubos
- pHmetro de mesada
- Agitador magnético
- Baño ultrasónico
- Destilador eléctrico
- Bomba de vacío
- Freezer -20 línea hogar (Whirlpool, Argentina)
- Computadora 586
- Microscopios
- Material de laboratorio de vidrio
- Software para análisis farmacocinético WinNonlin Professional 5.2 (Scientific consulting Inc., Cary, N.C.)

IV. METODOS

IV.1 MANEJO ANIMAL, ALIMENTACIÓN, IDENTIFICACIÓN

Los animales fueron mantenidos en régimen de ordeño o secado según correspondiera y con la alimentación adecuada a su época de lactancia. En este sentido todos tuvieron un sistema de pastoreo con suplementación de concentrado en el tambo al momento del ordeño.

Se mantuvo el sistema de identificación del establecimiento para el seguimiento individual. Estas siempre fueron dobles y en los casos donde se perdió alguna identificación se pidió agregar una nueva de manera de tener siempre doble identificación.

IV.2. DESCRIPCIÓN DE DOSIS Y ADMINISTRACIÓN

Luego de la selección animal y la confección de los grupos experimentales, cada animal fue pesado para establecer las dosis a administrar en los casos que así lo requería – intramuscular y endovenoso-. La administración de cada formulación se realizó luego del ordeño de la mañana siguiendo las normas de higiene adecuadas para cada vía de administración. Al finalizar la aplicación se consideró como tiempo cero del muestreo.

IV.2.1. Administración endovenosa

La dosis a administrar por la vía endovenosa fue de 10 mg por kilogramo de peso vivo. Esta se realizó -con el animal en el cepo y asegurado con bozal- en la vena yugular derecha, la administración en todos los casos fue rápida –de 5 a 10 segundos- sin eventos adversos.

IV.2.3. Administración intramuscular

La dosis a administrar por la vía intramuscular fue de 10 mg por kilogramo de peso vivo. Esta se realizó -con el animal en el cepo- en la cara posterior del muslo izquierdo -zona de los músculos isquiotibiales-. La administración en todos los casos fue rápida – de 10 a 20 segundos- y sin eventos adversos.

IV.2.3. Administración intramamaria

Inmediatamente después de terminado el ordeño de rutina se desinfectó cada pezón con un antiséptico yodado, se secó con papel tisú y se volvió a desinfectar la punta del pezón con alcohol isopropílico 70% según recomendación del NMC. Finalizada esta

maniobra se aplicó en cada cuarto mamario el contenido completo de una jeringa plástica intramamaria de azitromicina 125 o 250 mg.

La aplicación de las jeringas se efectuó con el siguiente orden: 1) cuarto posterior derecho; 2) cuarto posterior izquierdo; 3) cuarto anterior derecho y 4) el cuarto anterior izquierdo. Se determinó como tiempo cero (0) al finalizar la aplicación de la última jeringa.

IV.3.TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACION

IV.3.1. Muestras de sangre

Las extracciones de sangre se realizaron con los animales en la manga a partir de la vena yugular izquierda –de preferencia- o derecha; en algunos casos y para facilitar el manejo se tomaron muestras de la vena coccígea con los animales en el brete de ordeño o la manga.

Luego de la desinfección de la zona de extracción con un algodón embebido en alcohol; se tomaron las muestras de sangre con vacutainer de 10mL; o jeringa con aguja la cual era trasvasada inmediatamente a un tubo vacutainer para ser depositado en una gradilla inclinada a 45° en un local del tambo o dentro de una heladera térmica para facilitar la retracción del coágulo. Luego de la retracción del coágulo las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y posteriormente se procedió a la extracción del suero con pipetas Pasteur estériles (una para cada muestra).

El suero fue vertido en tubos de hemólisis (limpios, secos, estériles y rotulados) y mantenidos en freezer a -20°C hasta el momento de su análisis. Esta metodología fue empleada para la obtención de cada muestra sanguínea.

IV.3.2. Muestras de leche

Para la obtención de muestras de leche se procedió a despuntar por ordeño manual tres chorros de leche de cada cuarto, finalizado el despunte se recolectaba (en un recolector biológico de 50 mL de capacidad) un volumen aproximado de 10 mL por cada cuarto y siguiendo la misma rutina empleada para la aplicación de jeringas intramamarias -1) cuarto posterior derecho; 2) cuarto posterior izquierdo; 3) cuarto anterior derecho y 4) el cuarto anterior izquierdo-. Durante los muestreos se evitó el sellado pre y posordeño en todo el tambo.

Las muestras de leche así obtenidas fueron conservadas en los colectores biológicos estériles a -20°C hasta su ensayo.

Esta metodología fue empleada para todas las tomas de muestra de leche

IV.3.3. Análisis de las muestras

Los dos métodos más difundidos y utilizados para medir concentraciones de azitromicina en fluidos corporales y tejidos son: ensayo microbiológico, empleando la técnica de difusión en agar-placa (46) y cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector electroquímico (67, 68) o ultravioleta (69, 70). Ambos métodos presentan similar precisión y sensibilidad, por lo que los dos métodos son igualmente apropiados para determinar concentraciones de azitromicina en suero y tejidos (71, 32).

Tomando en cuenta estas referencias y considerando el volumen de muestras y los mayores costos del uso de la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se decidió emplear el método microbiológico tanto para el análisis de muestras de suero y leche como de tejidos.

IV.4. TECNICA ANALITICA

IV.4.1. Fundamento

El método biológico consiste en enfrentar concentraciones conocidas del antibiótico a testear (patrones), con un cultivo estandarizado de una cepa patrón de una bacteria sensible al mismo. A partir de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, se traza una línea patrón, en la que se interpolarán los halos de inhibición de crecimiento bacteriano producidos al enfrentar una muestra de concentración desconocida con el mismo cultivo. Posteriormente las concentraciones de antibiótico presentes en la muestra serán obtenidas por extrapolación desde la línea patrón.

IV.4.2. Desarrollo analítico y descripción del método

La determinación cuantitativa de azitromicina en suero y leche se realizó mediante el método microbiológico (técnica cilindro-placa de Grove & Randall) adaptado para este antimicrobiano (71, 94).

El método microbiológico consiste en la determinación de concentraciones desconocidas de un antibacteriano en muestras biológicas por comparación con patrones de concentración conocida de dicho antibacteriano. Para ello se utiliza un medio de cultivo

estándar (agar para antibióticos) en el que se inocula una cantidad fija y determinada del microorganismo sensible al antibacteriano. Una vez homogeneizado, el medio de cultivo se vuelca dentro de placas de vidrio de 25 x 25 cm de lado y 2,5 cm de altura. Posteriormente, sobre la superficie del agar gelificado, se colocan cilindros dentro de los cuales se siembran las muestras problema y los patrones. La placa es incubada durante 24 horas, período luego del cual se miden los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. A partir de los halos producidos por las concentraciones patrones se traza una línea de regresión. De esta manera, por interpolación de los diámetros de los halos producidos por las muestras problema, se extrapolan las concentraciones correspondientes.

Las muestras problema (tanto séricas como lácteas) fueron sembradas por duplicado. Se utilizó una placa de cultivo por animal para las muestras de suero y otra placa para las muestras de leche, cada una con sus correspondientes estándares de concentraciones conocidas del antibacteriano en estudio (curvas patrón). Este procedimiento se realizó en el mismo día, disminuyendo así la variabilidad inter-placa e inter-día.

Previamente al análisis de las muestras problema de cada protocolo se validó el método analítico utilizado. A tal fin se determinaron especificidad, linealidad, exactitud y repetibilidad (precisión) del método y se calculó el límite de cuantificación (LOQ) correspondiente.

Diluciones estándares y patrones

Azitromicina se encuentra en su forma anhidra con una pureza de 84%. Por lo tanto, para obtener una solución stock madre de azitromicina de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ debieron pesarse 11,90 mg de la sal, que fueron disueltos en 10 mL de metanol calidad cromatográfica. Dicha solución, almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantiene su potencia durante 6 meses.

A partir de la solución madre se prepararon las diluciones seriadas estándares utilizando como diluyente buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 8 estéril (94) y los patrones en plasma y en leche libres de residuos de antimicrobianos.

Para preparar el buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8 se mezclaron 5,3 mL de solución estéril de fosfato monobásico de sodio 0,2 M (solución A) con 94,7 mL de solución estéril de fosfato dibásico de sodio 0,2 M (solución B) y se llevó la mezcla a 200 mL con agua destilada estéril. Para preparar la solución A se diluyeron 27,8 g de fosfato monobásico de

sodio en 1000 mL de agua destilada estéril y para la solución B se diluyeron 53.65 g de fosfato dibásico de sodio en 1000 mL de agua destilada estéril.

Después de esterilizar el buffer en autoclave, se realizó el control del pH. El buffer se mantuvo refrigerado y el pH fue periódicamente controlado para asegurar la estabilidad del mismo.

El rango de concentraciones incluido en la recta de calibración estándar y en la recta patrón en suero fue 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$. Para la recta de calibración en leche el rango fue 0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$.

Inóculo bacteriano

El microorganismo test utilizado fue *Micrococcus luteus* ATCC 9341, provisto por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. C.G. Malbrán” (Buenos Aires, Argentina). A partir del mismo se sembraron en superficie picos de flauta con agar Müller-Hinton, los cuales fueron incubados a 35 °C durante 48 h.

Transcurrido ese tiempo, a partir de los picos de flauta se realizaron repiques (con el mismo medio y también en picos de flauta) de 24 h de incubación para la preparación del inóculo del día de la siembra. Estos cultivos se lavaron con 1,5 mL de solución fisiológica estéril cada uno. La solución obtenida fue diluida nuevamente con solución fisiológica estéril hasta alcanzar un 75% de transmisión, medida por espectrofotometría a 670 nm de longitud de onda (94) que corresponde a una concentración de $2 - 2,6 \times 10^7$ UFC/mL. A partir de esta suspensión se tomó 1 mL para inocular el medio de cultivo para antibióticos N° 1, cuyo volumen fue de 120 mL por placa.

Preparación de las placas

Para la preparación de las placas se utilizaron 120 mL de medio de cultivo para antibióticos N° 1 a una temperatura de 45-50 °C. El mismo fue preparado el día de la siembra siguiendo las instrucciones del fabricante y fue esterilizado en autoclave a 120 °C y a 1 atmósfera de presión durante 20 min. Una vez retirado del autoclave fue colocado en baño de María a 50 °C, temperatura a la cual se le adicionó 1 mL del inóculo bacteriano correspondiente. Se mezcló bien para tener una correcta distribución del inóculo en la totalidad del medio de cultivo, con la precaución de evitar la formación de burbujas.

La placa de vidrio (previamente numerada en la cara externa de la base para poder saber la ubicación de los cilindros) y templada a 35°C, se ubicó sobre una superficie correctamente nivelada.

El medio de cultivo inoculado fue vertido dentro de la placa de vidrio. Una vez solidificado el agar se colocaron los 49 cilindros de acero inoxidable de acuerdo al mapa guía y se ejerció sobre los mismos una ligera presión para lograr una correcta coaptación entre éstos y la superficie del medio.

Siembra de las placas

Se sembraron por cuadruplicado 200 μL de cada solución estándar (preparada con buffer) o solución patrón (preparada en suero o leche bovina) en cada cilindro, colocando su ubicación en la planilla (Nº de cilindro que recibió determinada muestra).

Las placas fueron incubadas en estufa a 35 °C durante 24 horas. Transcurrido el período de incubación y utilizando un calibre Vernier se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

A partir de los diámetros de los halos de inhibición se trazaron las líneas de regresión lineal entre estos y las concentraciones antimicrobianas presentes en los estándares y en los patrones. A partir de estas líneas de regresión se determinaron los correspondientes valores de intersección, pendiente y los coeficientes de correlación (r).

IV.4.3. Validación

Linealidad de la respuesta

La linealidad fue determinada a través de curvas de calibración de las concentraciones calculadas del antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$) y las concentraciones teóricas, a diferentes concentraciones del antimicrobiano ensayado (95). A partir de estas curvas fueron calculados coeficiente de correlación lineal (r), pendiente e intersección (96).

Las rectas de calibración fueron realizadas en 3 días distintos y cada una contenía 5 concentraciones y 4 repeticiones por cada concentración.

Especificidad de la técnica

La especificidad se evaluó sembrando en cada placa y por cuadruplicado buffer, leche y suero libres de residuos de antimicrobianos (diluyentes y muestras control). El objetivo fue corroborar la ausencia de sustancias con actividad inhibitoria intrínseca que pudieran interferir con la actividad inhibitoria del antimicrobiano a ensayar (96).

Exactitud de la técnica

La exactitud en la determinación de las concentraciones fue expresada como porcentaje de recuperación y se obtuvo a partir de comparar la concentración calculada en base a la recta de calibración (en leche o suero), con la concentración real y conocida del patrón.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_c}{C_r} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde C_c es la concentración calculada y C_r es la concentración real.

Se consideró adecuado un valor de recuperación comprendido entre 60% y 110%.

Precisión de la técnica

Para evaluar la precisión de la técnica se determinó el grado de repetibilidad, el cual está relacionado con la dispersión de una serie de mediciones de una misma muestra sobre un valor promedio, el cual corresponde a la varianza de la población y es estimada por el desvío estándar (DE). Para comparar la dispersión de 2 series de mediciones se utiliza el desvío estándar relativo o coeficiente de variación (CV) que es expresado como porcentaje.

$$\text{CV} = \frac{\text{DE}}{\bar{X}} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde \bar{X} es el valor promedio de una serie de mediciones y el estimador de la media poblacional (μ).

La evaluación de la precisión se realizó mediante la estimación de los CV de los halos de inhibición obtenidos a partir de los estándares y patrones en suero y en leche. Cada concentración fue sembrada por cuadruplicado en una misma placa y durante 3 días,

a partir de lo cual se pudieron calcular los CV intra-día e inter-día. Los valores de los CV aceptables debieron ser inferiores al 20%.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor concentración para la cual la reproducibilidad de los análisis no excede un CV del 20%.

Análisis de las muestras problema

Para evitar la variabilidad inter-placa, se incluyó en cada placa sembrada con muestras problema una batería de diluciones patrones del antimicrobiano en estudio en suero o leche, según correspondiera.

A través de la medición de la actividad inhibitoria en los patrones, se construyeron las rectas de regresión lineal:

$$y = b + a x \quad \text{Ec. 3}$$

Donde y es la concentración del antimicrobiano, b es el punto de intersección con el eje de la abscisa, a es la pendiente de la recta y x es el halo de inhibición.

Los estimadores de a y b fueron calculados de la siguiente manera:

$$a = \frac{\sum X_i - b \sum Y_i}{n} \quad \text{Ec. 4}$$

$$b = \frac{\sum Y_i X_i - (\sum Y_i \sum X_i) / n}{\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2 / n} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde Y_i es la concentración del antimicrobiano, X_i es el diámetro del halo de inhibición y n es el número de mediciones.

El estimador del ajuste fue el coeficiente de correlación (r) que se calculó como:

$$r = \frac{n \sum (Y_i X_i) - \sum Y_i \sum X_i}{\sqrt{[n \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2][n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2]}} \quad \text{Ec. 6}$$

Los r considerados aceptables debieron ser superiores a 0,9 en todas las placas.

La concentración del antimicrobiano en las muestras problema se expresó en $\mu\text{g/mL}$ de suero o leche y se calculó en función del diámetro del halo de inhibición medido utilizando la ecuación de la recta de regresión, es decir:

$$\text{"Concentración"} = b + a \text{"diámetro del halo"} \quad \text{Ec.7}$$

Durante la determinación de azitromicina, administrada por vía IMM, hubo casos en los que los halos de inhibición eran tan amplios que limitaban su lectura y por ello se realizaron diluciones con leche bovina blanco. Las concentraciones así determinadas debieron ser corregidas por el factor de dilución empleado. De esta manera, si la muestra estaba diluida 1:10, la concentración final fue determinada de acuerdo a la Ecuación 8

$$\text{"Concentración final"} = \frac{\text{"Concentración inicial"} \cdot 100}{10} \quad \text{Ec. 8}$$

Resultados de la validación del método microbiológico

Azitromicina en suero

Los parámetros resultantes de las rectas de calibración de los estándares en buffer y los patrones en suero se presentan en la Tabla I y las rectas de calibración correspondientes pueden observarse en la Figura I y la Figura II.

En la Tabla II se presenta la variabilidad intra-día correspondiente a cada día de análisis y la variabilidad inter-día correspondiente a los 3 días de análisis.

El porcentaje de recuperación para el rango de concentraciones 0,0625 - 0,25 $\mu\text{g/mL}$ fue $70,97 \pm 2,69\%$ y porcentaje de recuperación para el rango 0,5 - 1 $\mu\text{g/mL}$ fue $103,25 \pm 4,88\%$. El LOQ de azitromicina en suero bovino fue 0,0625 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla I: Valores de intersección, pendiente y coeficiente de correlación ($\bar{X} \pm \text{DS}$) de las rectas de calibración de estándares de azitromicina en buffer y patrones en suero.

	ESTÁNDARES	PATRONES
INTERSECCIÓN	-1,1401 \pm 0,2021	-1,2833 \pm 0,071
PENDIENTE	0,9887 \pm 0,1630	1,3768 \pm 0,068
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	0,9200 \pm 0,0200	0,9679 \pm 0,0013

Tabla II: Variabilidad (coeficientes de variación) intra-día e inter-día correspondiente a los halos de inhibición de azitromicina (0,0625 - 1 $\mu\text{g/mL}$) en suero bovino fortificado.

CONCENTRACIÓN	HALOS DE INHIBICIÓN							
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Inter-día	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
0,125 $\mu\text{g/mL}$	1,001	6,98	0,980	10,39	0,978	8,44	0,987	1,170
0,25 $\mu\text{g/mL}$	1,163	5,99	1,156	2,78	1,144	6,82	1,287	18,414
0,5 $\mu\text{g/mL}$	1,313	2,62	1,328	1,11	1,342	1,28	1,327	1,151
1 $\mu\text{g/mL}$	1,608	2,71	1,583	1,68	1,657	3,75	1,616	2,307

Figura I: Recta de calibración mediante el ajuste lineal del halo de inhibición bacteriana de estándares de Azitromicina en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8 frente al rango de concentraciones 0,0625 - 1 µg/mL.

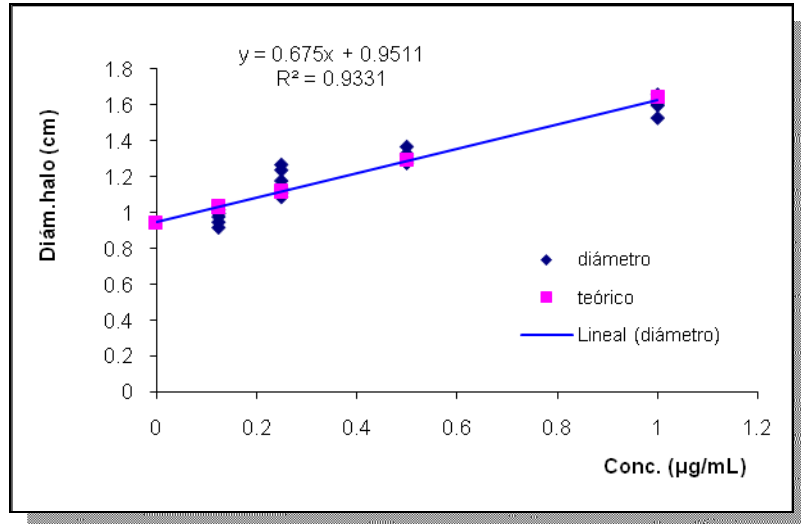
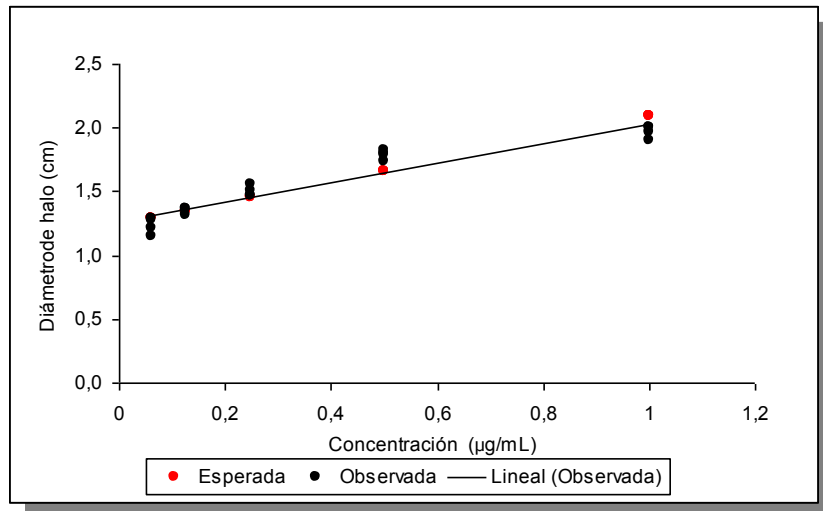


Figura II: Recta de calibración mediante el ajuste lineal del halo de inhibición bacteriana de patrones de azitromicina en suero bovino frente al rango de concentraciones 0,0625 - 1 µg/mL



Azitromicina en Leche

Los parámetros resultantes de las rectas de calibración de los estándares en buffer y los patrones en leche se presentan en la Tabla III. Las rectas de calibración correspondientes pueden observarse en la Figura III y la Figura IV.

En la Tabla IV se presenta la variabilidad intra-día correspondientes a cada día de análisis y la variabilidad inter-día correspondiente a los 3 días de análisis.

El porcentaje de recuperación de la técnica calculado para el rango de concentraciones 0,125 - 0,5 $\mu\text{g/mL}$ fue $98,09 \pm 8,45\%$ y para el rango 1 - 2 $\mu\text{g/mL}$ fue $103,11 \pm 7,20\%$. El LOQ de azitromicina en leche bovina que fue de 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla III: Valores de intersección, pendiente y coeficiente de correlación ($\bar{X} \pm \text{DS}$) de las rectas de calibración de estándares de azitromicina en buffer y patrones en leche.

	ESTÁNDARES	PATRONES
INTERSECCIÓN	$-0,7968 \pm 0,1039$	$-0,0776 \pm 0,0191$
PENDIENTE	$0,7783 \pm 0,0363$	$0,9438 \pm 0,0069$
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$0,9202 \pm 0,0161$	$0,9522 \pm 0,1521$

Tabla IV: Variabilidad (coeficientes de variación) intra-día e inter-día correspondiente a los halos de inhibición de azitromicina (0,125 - 2 $\mu\text{g/mL}$) en leche bovina fortificado.

CONCENTRACIÓN	HALOS DE INHIBICIÓN							
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Inter-día	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,800	0,00	0,800	0,00	0,822	2,92	0,807	1,43
1 $\mu\text{g/mL}$	1,113	6,86	1,013	8,44	1,165	7,11	1,097	7,37
1,5 $\mu\text{g/mL}$	1,450	3,43	1,477	1,64	1,335	1,03	1,423	5,18
2 $\mu\text{g/mL}$	2,315	2,65	2,290	2,80	2,298	2,97	2,301	0,55

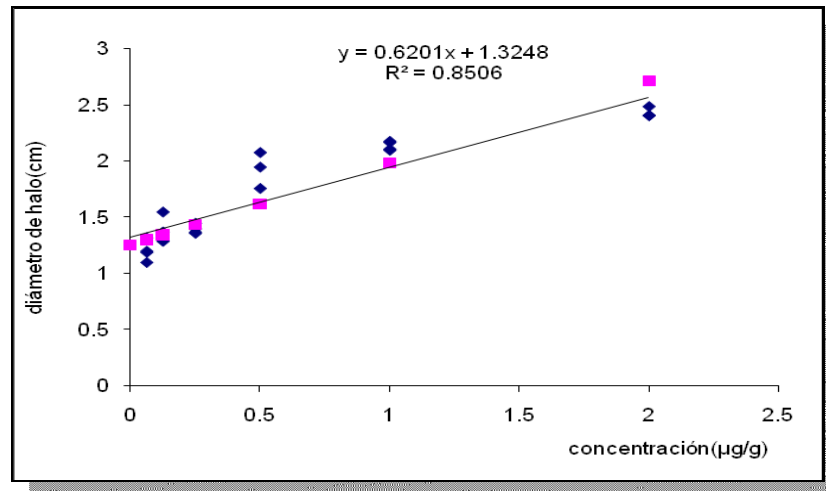


Figura III: Recta de calibración mediante el ajuste lineal del halo de inhibición bacteriana de estándares de azitromicina en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8 frente al rango de concentraciones 0,0625 - 1 µg/mL.

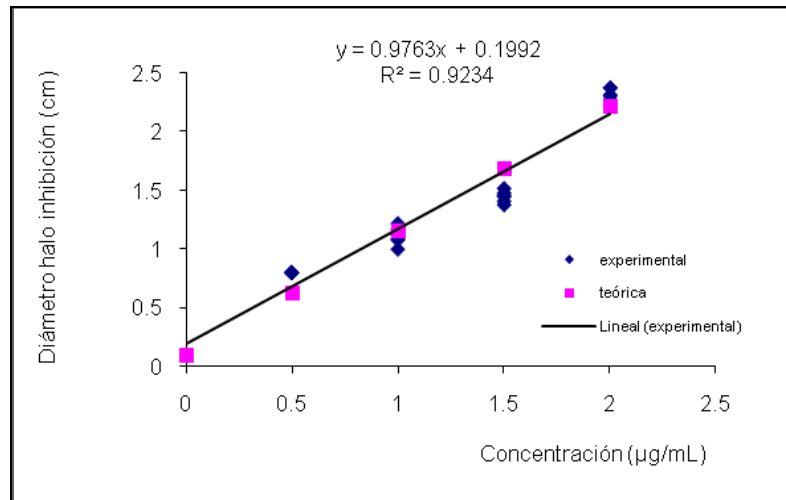


Figura IV: Recta de calibración mediante el ajuste lineal del halo de inhibición bacteriana de patrones de azitromicina en leche bovina frente al rango de concentraciones 0,125 - 2 µg/mL.

V. EXPERIMENTOS REALIZADOS

V.1. “Análisis farmacocinético de azitromicina luego de su administración endovenosa en vacas lecheras Holando Argentino en lactación, sanas y con mastitis subclínica”

Se seleccionaron 12 vacas en ordeño, seis animales sanos y seis con mastitis subclínica los cuales recibieron luego de su ordeño una aplicación endovenosa de azitromicina 10 %, dosis 10 mg/kg de peso vivo y posteriormente se procedió a la toma de muestras de sangre y leche.

- Las muestras de leche fueron tomadas a partir del tiempo cero en los siguientes horarios: 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas.

- Las muestras de sangre fueron tomadas a partir del tiempo cero en los siguientes horarios: 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 y 168 horas.

V.2. “Análisis farmacocinético de azitromicina luego de sus administración Intramuscular en vacas lecheras Holando Argentino en lactación, sanas y con mastitis subclínica”

Se seleccionaron 12 vacas en ordeño, seis animales sanos y seis con mastitis subclínica los cuales recibieron luego de su ordeño una aplicación intramuscular de azitromicina 10 %, dosis 10 mg/kg de peso vivo y posteriormente se procedió a la toma de muestras de sangre y leche.

- Las muestras de leche fueron tomadas a partir del tiempo cero en los siguientes horarios: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas.

- A partir del tiempo cero se tomaran las siguientes muestras de sangre: 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 y 168 horas.

V.3. “Análisis farmacocinético de azitromicina luego de sus administración Intramamaria en vacas lecheras Holando Argentino en lactación, sanas y con mastitis subclínica”

Se seleccionaron 12 vacas en ordeño, seis animales sanos y seis con mastitis subclínica a los cuales se le aplico cuatro jeringas intramamarias de azitromicina 125 mg (una en cada cuarto), cada doce horas, durante tres ordeños consecutivos y luego se procedió a la toma de muestras de sangre y leche.

- Las muestras de leche fueron tomadas según el siguiente esquema:

Primer set de jeringas intramamarias y toma de muestras de leche a 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Ordeñe y aplicación del segundo set de jeringas y toma de muestras a 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Ordeñe y aplicación del tercer set de jeringas y toma de muestras a las 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Luego y durante cuatro días se tomo una muestra en cada ordeñe.

Las muestras de sangre se tomaron según el siguiente esquema:

Primer set de jeringas intramamarias y toma de muestras de leche a los 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Ordeñe y aplicación del segundo set de jeringas y toma de muestras a los 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Ordeñe y aplicación del tercer set de pomos y toma de muestras a los 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Luego y durante cuatro días se tomó una muestra en cada ordeñe.

V.4 “Análisis farmacocinético de azitromicina luego de sus administración intramamaria en vacas lecheras Holando Argentino al momento de secado sanas y con mastitis subclínica”

Se seleccionaron 12 vacas en ordeñe, seis animales sanos y seis con mastitis subclínica a los cuales se les aplicaron cuatro jeringas intramamarias de azitromicina 250 mg (una en cada cuarto), luego del último ordeñe de su lactación y se procedió a la toma de muestras de sangre y leche.

- Las muestras de leche fueron tomadas a partir del tiempo cero en los siguientes horarios: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas.

- Las muestras de sangre fueron tomadas a partir del tiempo cero en los siguientes horarios: 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 y 144 horas.

V.5. “Estudio de penetración tisular de azitromicina en terneros Holando Argentino”

12 terneros sanos Holando Argentino con un peso entre 140 y 180 kilogramos de peso recibieron una aplicación intramuscular de azitromicina 10 %, a una dosis de 10 mg/kg

y posteriormente se procedió al sacrificio por exanguinación para la toma de muestras de los siguientes tejidos: hígado, riñón, músculo, grasa, pulmón, cerebro y testículo.

Los animales se sacrificaron de a uno o dos en los siguientes tiempos postratamiento: 12 horas (un animal), 24, 48, 72 y 120 horas (dos animales por punto), 240 y 600 horas (un animal por punto).

- A partir del tiempo cero se tomaron las siguientes muestras de suero: 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276 y 600 horas.

VI. RESULTADOS

Los ensayos planificados se realizaron según el diseño planteado y sin desvíos significativos que destacar.

La selección de los animales para cada ensayo resultó compleja y demandó bastante tiempo, ya que se trabajó en tambos que tenían entre 80 y 120 vacas en ordeño y en esas cantidades era bastante difícil acotar todas las variables. En este sentido se priorizaron las variables según la importancia de estas para cumplir con los objetivos de esta tesis.

Los criterios de inclusión para las vacas sanas fueron:

- a- menos de 200.000 células somáticas
- b- entre 8 y 25 litros de producción diaria de leche
- c- los cuatro cuartos mamarios funcionales
- d- ubres bien implantadas

Los criterios de inclusión para las vacas con mastitis fueron:

- a- más de 600.000 células somáticas
- b- entre 8 y 25 litros de producción diaria de leche
- c- los cuatro cuartos funcionales
- d- ubres bien implantadas

Otras variables como cantidad de lactancias y período de lactación se ajustaron de acuerdo a la cantidad de animales disponibles luego de la primera clasificación realizada por criterios de inclusión. En el caso del ensayo de secado, el momento de lactación fue una variable de inclusión.

Tanto las administraciones del producto como la toma de muestras de sangre y de leche se realizaron sin dificultad y ni desvíos que destacar.

Luego de la puesta a punto y validación del método analítico las muestras fueron analizadas en un período de 3 meses. Los análisis se realizaron por animal, esto quiere decir que se descongelaba el total de muestras de un animal y se sembraban todas las muestras juntas (aunque en más de una placa), acotando con esto variables del equipamiento y del análisis entre días para un animal.

Todo el material de laboratorio a utilizar durante el análisis de las muestras (vidrio, patrones, medios de cultivo, inóculos, cilindros, etc.) fue preparado por el tesista y un ayudante; así como la siembra de muestras y lectura de los resultados.

Los datos recogidos de las placas por cada muestra –diámetro de cilindro- fueron registrados en planillas diseñadas a tal fin. A través de la medición de la actividad inhibitoria en los patrones, se construyeron las rectas de regresión lineal

La concentración del antimicrobiano en las muestras problema se expresó en $\mu\text{g/mL}$ de plasma o leche y se calculó en función del diámetro del halo de inhibición medido utilizando la ecuación de la recta de regresión, es decir:

$$\text{“Concentración”} = b + a \cdot \text{“diámetro del halo”} \quad \text{Ec.9}$$

Los datos así obtenidos fueron analizados con el paquete informático WinNonlin Professional 5.2 (Scientific Consulting Inc., Cary, N.C.) para obtener los parámetros farmacocinéticos en suero y leche, y para cada uno de los ensayos realizados en esta tesis.

Finalmente, a partir de los parámetros cinéticos obtenidos se realizó un análisis estadístico para determinar la existencia o no de diferencias en el comportamiento farmacocinético de azitromicina entre vacas sanas y vacas con mastitis.

El análisis estadístico de los datos generados en este estudio farmacocinético fue realizado utilizando el Software JMP Statistical Discovery Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Version 4., fijando, en todos los casos, un límite de significancia de 5% ($P= 0.05$).

VI. 1. RESULTADOS DEL ENSAYO INTRAVENOSO

El ensayo endovenoso fue realizado en el establecimiento “Ojo de Agua”, ubicado en el partido de Tandil, provincia de Buenos Aires.

La selección de los animales se realizó por recuento de células somáticas obtenidas a partir del control lechero mensual y recontrolado a partir de muestras tomadas por el tesista en el laboratorio de calidad de leche de la firma “La Serenísima” partido de General Rodríguez, Pcia de Buenos Aires.

Luego de la administración intravenosa de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg no se observaron reacciones adversas locales o generales. La aplicación se realizó en forma de bolo en la vena yugular izquierda en un tiempo promedio de 10 segundos por animal.

Luego de la aplicación, cada animal fue alojado en un brete del tambo para continuar con la toma de muestras de sangre y leche de acuerdo con el diseño de toma de muestras del experimento. Solo se perdieron dos muestras de sangre y una de leche, las cuales figuran como SM (sin muestra) en las tablas de concentraciones correspondientes.

La aplicación fue realizada por el tesista y dos operarios para el manejo de manga y sujeción de animales. La toma de muestra fue realizada por dos equipos de dos personas cada uno y una quinta persona para indicar la secuencia de muestreo y realizar el registro de datos. A partir de las 36 horas el trabajo fue realizado en cada ordeño y hasta la finalización del experimento por el tesista y un colaborador.

En las Tablas 1 y 2 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en suero de animales sanos y con mastitis respectivamente.

En las Tablas 3 y 4 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en leche de animales sanos y con mastitis respectivamente.

Las Figuras 1 y 2 muestran las curvas promedio de las concentraciones de azitromicina en suero y leche de animales sanos y con mastitis.

En la Tabla 5 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales sanos luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 6 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales con mastitis luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 7 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales sanos luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 8 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 9 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en suero de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 10 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en leche de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 11 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, Clearance, $V_{d_{ss}}$, $V_{\text{área}}$ y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

En la Tabla 12 se observa el valor obtenido de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} , MRT y F_L en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Tabla 1: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg en vacas sanas en lactación.

Animal N°	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Promedio	DE
Litros día	16,0	18,0	21,0	16,5	22,0	18,5	18,667	2,401
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0.083	3,102	2,620	2,813	2,159	2,970	3,157	2,803	0,372
0.166	2,709	2,390	2,757	1,920	2,600	2,720	2,516	0,321
0.25	2,480	2,076	SM	1,801	2,427	2,282	2,213	0,279
0.5	2,379	1,897	2,048	1,759	2,138	2,028	2,042	0,212
0.75	2,310	1,973	2,028	1,759	2,103	1,856	2,005	0,193
1	2,193	1,918	1,904	1,732	2,048	1,814	1,935	0,165
2	2,207	1,931	1,801	1,746	1,959	1,773	1,903	0,172
3	1,807	1,801	1,787	1,615	1,911	1,773	1,782	0,096
4	1,918	1,601	1,567	1,560	1,821	1,587	1,676	0,154
6	1,511	1,629	1,684	1,429	1,794	1,511	1,593	0,134
8	1,298	1,381	1,443	1,174	1,704	1,477	1,413	0,179
12	1,078	1,215	1,195	1,030	1,167	1,009	1,116	0,088
24	1,098	1,195	0,961	1,057	1,016	0,816	1,024	0,129
36	0,699	1,043	0,479	0,623	1,030	0,768	0,774	0,225
48	0,851	0,782	0,472	0,548	0,720	0,672	0,674	0,143
60	SM	0,548	0,417	0,314	0,713	0,658	0,530	0,166
72	0,562	0,493	0,369	0,231	0,568	0,486	0,451	0,130
84	0,438	0,479	0,238	0,231	0,568	0,389	0,391	0,134
96	0,417	0,348	0,417	0,369	0,327	0,327	0,368	0,041
108	0,396	0,465	0,417	0,307	0,300	0,279	0,361	0,076
120	0,142	0,018	0,038	0,093	0,224	0,190	0,118	0,082

SM: Sin muestra

Tabla 2: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg en vacas con mastitis y en lactación.

Animal N°	A7	A8	A9	A10	A11	A12	Promedio	DE
Litros día	15,0	18,0	17,0	20,0	20,0	19,0	18,167	1,941
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0.083	3,391	2,819	2,950	2,847	2,813	2,441	2,877	0,306
0.166	2,599	2,570	2,730	2,650	2,480	2,427	2,576	0,111
0.25	2,159	2,282	2,159	2,214	2,103	SM	2,183	0,068
0.5	2,186	2,241	1,849	2,035	2,097	2,007	2,069	0,140
0.75	2,062	2,186	1,863	1,952	2,055	1,973	2,015	0,111
1	2,021	1,931	1,883	1,849	2,035	1,904	1,937	0,075
2	1,690	1,897	1,697	1,780	1,925	1,794	1,797	0,098
3	1,656	1,842	1,580	1,615	1,883	1,656	1,705	0,126
4	1,642	1,794	1,573	1,580	1,863	1,663	1,686	0,118
6	1,629	1,642	1,450	1,525	1,732	1,477	1,576	0,109
8	1,649	1,491	1,333	1,511	1,388	1,466	1,473	0,109
12	1,160	1,388	1,333	1,339	1,271	1,319	1,302	0,079
24	0,954	1,243	1,209	1,236	1,209	1,243	1,182	0,113
36	0,968	0,968	0,961	0,919	0,981	0,809	0,934	0,065
48	0,906	0,947	0,775	0,706	0,747	0,679	0,793	0,109
60	0,789	0,757	0,734	0,665	0,699	0,644	0,715	0,055
72	0,727	0,699	0,679	0,623	0,630	0,610	0,661	0,047
84	0,589	0,644	0,568	0,617	0,603	0,527	0,591	0,041
96	0,637	0,527	0,506	0,493	0,527	0,410	0,517	0,073
108	SM	0,486	0,479	0,479	0,472	0,396	0,462	0,037
120	0,169	0,197	0,266	0,266	0,224	0,348	0,245	0,063

SM: Sin muestra

Tabla 3: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg en vacas sanas y en lactación.

Animal N°	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Promedio	DE
Litros dia	16,0	18,0	21,0	16,5	22,0	18,5	18,667	2,401
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,166	ND	ND	ND	ND	1,690	ND	1,690	NC
0,332	ND	0,346	ND	ND	1,853	ND	1,100	1,066
0,5	1,066	1,064	ND	0,371	2,047	ND	1,137	0,690
0,75	ND	1,184	ND	0,551	2,783	ND	1,506	1,150
1	1,750	1,941	0,208	1,113	3,048	0,201	1,377	1,102
2	2,063	2,350	1,823	1,727	3,650	0,916	2,088	0,904
3	2,232	2,549	2,016	2,650	4,242	1,439	2,521	0,948
4	2,756	3,077	2,439	2,989	4,171	1,836	2,878	0,777
6	3,390	3,725	3,939	3,466	4,692	2,665	3,646	0,670
8	3,331	3,357	3,727	3,678	4,110	2,813	3,503	0,442
12	3,399	3,107	3,862	3,816	4,191	3,335	3,618	0,404
24	3,095	2,749	3,669	3,212	3,916	3,301	3,323	0,416
36	3,044	2,559	3,169	3,222	3,354	3,028	3,063	0,275
48	2,723	2,420	2,823	3,180	2,783	2,790	2,786	0,243
60	2,511	2,519	2,621	2,968	2,078	2,608	2,551	0,286
72	2,503	2,300	2,641	2,915	1,976	2,472	2,468	0,316
84	2,148	2,340	2,141	2,819	1,608	2,313	2,228	0,392
96	2,215	2,071	1,891	2,109	1,751	2,188	2,038	0,181
108	2,308	SM	1,862	2,056	1,588	2,018	1,966	0,265
120	1,826	2,001	1,381	1,971	1,078	1,700	1,660	0,363

ND: No detectado

NC: No calculado

SM: Sin muestra

Tabla 4: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg en vacas con mastitis y en lactación.

Animal N°	A7	A8	A9	A10	A11	A12	Promedio	DE
Litros día	15,0	18,0	17,0	20,0	20,0	19,0	18,167	1,941
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,166	ND	ND	ND	0,628	ND	ND	0,628	NC
0,332	1,165	ND	ND	0,777	ND	ND	0,971	0,274
0,5	1,823	ND	0,936	1,178	ND	ND	1,312	0,458
0,75	2,869	3,209	1,371	1,304	ND	ND	2,188	0,993
1	3,036	3,379	1,571	1,654	0,051	0,605	1,716	1,307
2	3,768	3,790	1,777	1,843	1,266	1,626	2,345	1,129
3	3,944	3,923	2,114	2,010	1,571	2,150	2,619	1,039
4	3,851	3,887	2,269	2,302	2,117	2,461	2,814	0,824
6	3,944	3,899	2,703	2,222	2,857	2,689	3,052	0,706
8	3,888	3,633	2,486	2,033	2,948	2,564	2,925	0,714
12	3,731	3,572	2,320	2,313	2,961	2,882	2,963	0,600
24	3,759	3,415	2,017	2,336	2,987	2,799	2,886	0,651
36	3,379	3,294	2,000	1,866	2,727	2,695	2,660	0,631
48	2,897	3,512	1,868	1,895	2,500	2,633	2,551	0,624
60	2,573	2,580	1,834	1,809	2,383	2,206	2,231	0,346
72	2,601	2,374	1,742	1,511	2,065	2,212	2,084	0,403
84	2,471	2,229	1,359	1,499	2,026	1,950	1,922	0,425
96	2,045	2,108	1,319	1,121	2,130	1,888	1,768	0,438
108	1,999	2,072	1,388	1,488	1,844	1,874	1,777	0,277
120	1,600	1,491	0,976	1,218	1,642	1,833	1,460	0,312

ND: No detectado

NC: No calculado

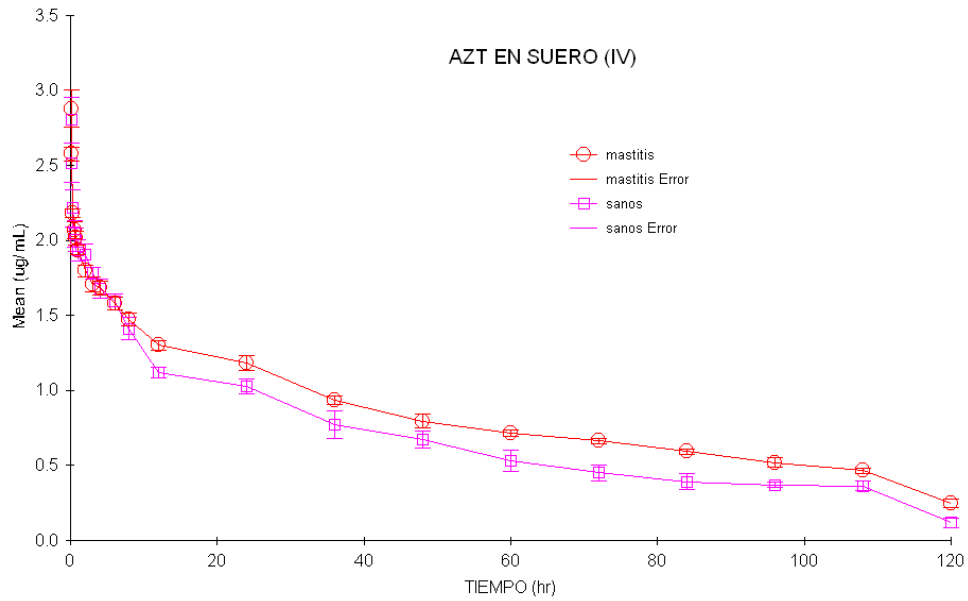


Figura 1: Concentraciones promedio de azitromicina en suero en función del tiempo, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg a seis vacas sanas y con mastitis en período de lactación.

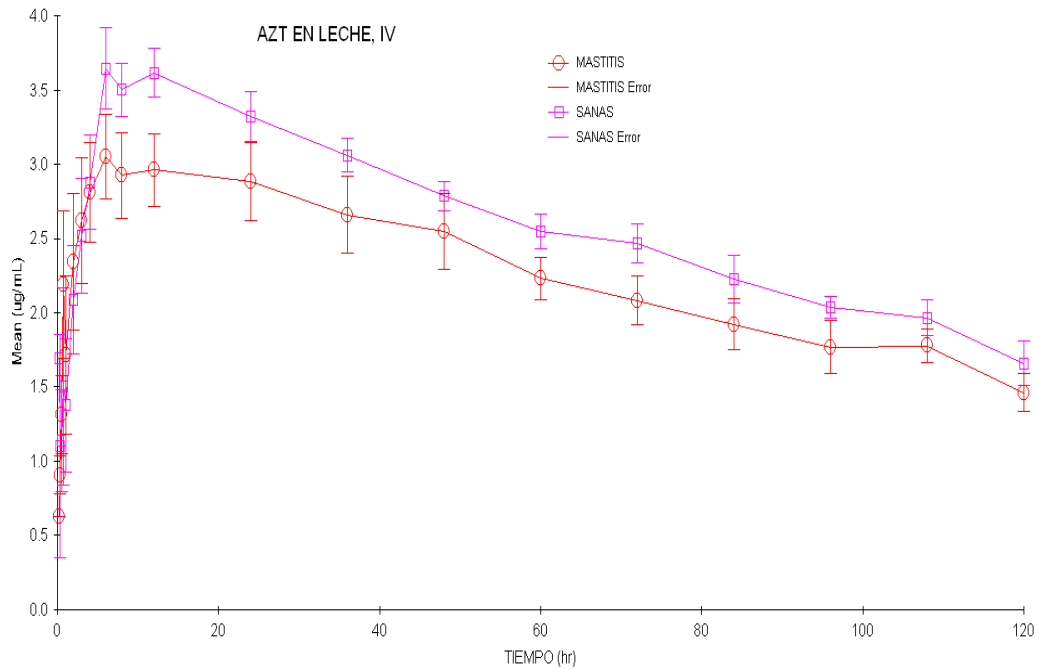


Figura 2: Concentraciones promedio de azitromicina en leche en función del tiempo, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg a seis vacas sanas y con mastitis en período de lactación.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	3.55	2.87	2.86	2.43	3.39	3.67	3.13	0.48
λ_z (1/h)	0.016	0.031	0.020	0.018	0.015	0.015	0.019	0.006
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	42.7	22.7	35.1	38.1	45.4	47.8	38.6	9.11
V_{area} (ml/kg)	6316.6	3581.3	6838.9	7561.8	6139.6	7515.8	6325.7	1467.9
V_{ss} (ml/kg)	5636.8	4631.1	5864.7	6564.0	5733.8	6858.4	5881.5	783.0
CL (ml/h/kg)	102.4	109.5	135.2	137.6	93.7	109.0	114.6	17.9
$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	89.0	90.7	72.0	67.7	92.3	78.6	81.7	10.4
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	97.6	91.3	74.0	72.7	106.7	91.7	89.0	13.4
$MRT_{0-t_{\text{last}}}$ (h)	42.7	41.5	39.8	38.4	41.8	41.9	41.0	1.61
$MRT_{0-\infty}$ (h)	55.0	42.3	43.4	47.7	61.2	62.9	52.1	8.94

C_0 : concentración al tiempo cero; λ_z : lambda: pendiente fase de eliminación; $T_{1/2}\lambda_z$: semivida de eliminación; V_{area} : volumen de distribución; V_{ss} : volumen de distribución al estado estable; CL/F_{mam} : aclaramiento corporal; $AUC_{0-t_{\text{last}}}$: área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el momento 0 hasta la última concentración; $AUC_{0-\infty}$: área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el momento 0 al infinito; $MRT_{0-t_{\text{last}}}$: tiempo medio de residencia desde cero al último tiempo detectado; $MRT_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia desde cero al infinito.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	4.42	3.09	3.19	3.07	3.18	2.45	3.23	0.64
λ_z (1/h)	0.014	0.014	0.013	0.013	0.013	0.012	0.013	0.001
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	49.9	48.6	55.0	55.6	52.3	57.0	53.1	3.36
V_{area} (ml/kg)	6442.3	5885.6	6600.3	6723.0	6505.4	6761.3	6486.3	318.7
V_{ss} (ml/kg)	5528.0	5204.6	6066.8	6124.2	5709.0	6678.6	5885.2	518.0
CL (ml/h/kg)	99.5	105.1	98.8	97.7	99.4	92.9	98.9	3.92
$\text{AUC}_{0-\text{ti}as}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	111.7	119.1	120.2	119.3	116.0	121.7	118.0	3.60
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	89.5	83.9	83.2	83.8	86.2	82.2	84.8	2.65
$\text{MRT}_{0-\text{ti}ast}$ (h)	45.8	44.9	45.5	44.9	44.6	43.8	44.9	0.71
$\text{MRT}_{0-\infty}$ (h)	61.8	62.0	72.9	73.1	66.2	81.3	69.5	7.61

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 5

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0.0049	0.0042	0.0088	0.0058	0.0119	0.0059	0.0069	0.0029
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	140.2	166.7	78.8	118.6	58.4	116.8	113.3	39.5
T_{max} (h)	12.0	6.0	6.0	12.0	6.0	12.0	9.0	3.29
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.40	3.73	3.94	3.82	4.69	3.34	3.82	0.49
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	311.8	293.7	315.8	340.0	308.2	304.6	312.3	15.5
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	681.2	775.0	472.8	677.3	399.1	591.0	599.4	141.3
F_L %	350.5	323,8	438.6	502.2	333.9	387.5	389.3	69.5
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	55.3	55.7	52.2	55.0	46.9	55.8	53.5	3.48
$MRT_{0-\infty}$ (h)	200.1	245.0	112.5	172.6	82.8	168.6	163.6	58.7

λ_z : lambda: pendiente fase de eliminación; $T_{1/2}\lambda_z$: semivida de eliminación; T_{max} : tiempo al que se produce la C_{max} ; C_{max} : máxima concentración observada post administración; $AUC_{0-t_{last}}$: área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el momento 0 hasta la última concentración; $AUC_{0-\infty}$: área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el momento 0 al infinito; F_L : biodisponibilidad en leche; $MRT_{0-t_{last}}$: tiempo medio de residencia desde cero al ultimo tiempo detectado; $MRT_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia desde cero al infinito.

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0.0076	0.0076	0.0068	0.0062	0.0054	0.0048	0.0064	0.0012
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	91.4	91.3	101.7	111.0	128,4	143.6	111,2	21,1
T_{max} (h)	3.0	3.0	6.0	24.0	24.0	12.0	12.0	9.86
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.94	3.92	2.70	2.34	2.99	2.88	3.13	0.66
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	336.6	332.6	208.7	207.8	278.1	274.3	273,0	56,6
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	547.5	528.9	351.9	403.0	582,2	654.0	511,2	113,3
F %	301.3	279.3	173.6	174.2	239.7	225.4	232,25	52,7
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	51.8	52.0	53.1	53.4	55,6	55.7	53.6	1,69
$MRT_{0-\infty}$ (h)	128.9	126.1	140.0	163.2	185,9	213.3	159,6	34,7

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos promedios, obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas y seis con mastitis, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	3.129	0.482	3.234	0.644
λ_z (1/h)	0.019	0.006	0.013	0.001
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	38.6	9.11	53.07	3.36
V_{area} (ml/kg)	6325.6	1467.9	6486.3	318.6
V_{ss} (ml/kg)	5881.5	783.0	5885.2	517.9
CL (ml/h/kg)	114.6	17.9	98,9	3,92
$\text{AUC}_{0-\text{tlast}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	81.7	10.4	118,0	3,60
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	89.0	13.4	84.8	2.65
$\text{MRT}_{0-\text{tlast}}$ (h)	41.0	1.61	44.9	0.71
$\text{MRT}_{0-\infty}$ (h)	52.1	8.94	69.5	7.61

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 5

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos promedios obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas y seis con mastitis, luego de su administración intravenosa a razón de 10 mg/kg

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0,007	0,003	0,007	0,001
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	113,3	39,5	111,2	21,1
T_{max} (h)	9,0	3,29	12,0	9,86
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3,82	0,49	3,13	0,66
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	312,3	15,48	273,0	56,6
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	599,4	141,3	511,2	113,3
F_L (%)*	389,4	69,4	232,3	52,7
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	53,5	3,48	53,6	1,69
$MRT_{0-\infty}$ (h)	163,6	58,6	159,6	34,7

$$* (AUC_{leche}/AUC_{suero}) \cdot 100$$

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 11. Valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, Clearance, V_{dss} , $V_{\text{área}}$ y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	81,71 ± 10,44	118,0 ± 3,60	0,0009***
CL (ml/h/kg)	114,57 ± 17,86	98,9 ± 3,92	0,0468*
V_{ss} (ml/kg)	5881 ± 783	5885 ± 517	0,4259
$V_{\text{área}}$ (ml/kg)	6325 ± 1467	6486 ± 318	0,2984
MRT _{0-tlast} (h)	41,02 ± 1,606	44,90 ± 0,70	0,0019**

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

*Diferencia significativa

** Diferencia altamente significativa

*** Diferencia muy altamente significativa

Tabla 12. Valor obtenido de P , luego del análisis estadístico de AUC, $t_{1/2\lambda z}$, C_{max} , T_{max} , MRT y F_L en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	312 ± 15,48	273,0 ± 56,6	0.0631
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	113,3 ± 39,5	111,2 ± 21,1	0,4530
C_{max} (µg/ml)	3,81 ± 0,48	3,13 ± 0,66	0,0563
T_{max} (h)	9,00 ± 3,28	12,00 ± 9,85	0,5000
MRT _{0-tlast} (h)	53,50 ± 3,48	53,26 ± 1,69	0,4618
F_L (%)	389,4 ± 69,35	232,25 ± 52,71	0,0108**

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

VI. 2. RESULTADOS DEL ENSAYO INTRAMUSCULAR

El ensayo intramuscular fue realizado en el establecimiento “El Recreo” ubicado en el partido de Brandsen, provincia de Buenos Aires.

La selección de los animales se realizó por recuento de células somáticas obtenidas a partir del control lechero mensual y recontrolado a partir de muestras tomadas por el tesista en el laboratorio de calidad de leche de la firma “La Serenísima” partido de General Rodríguez, Pcia de Buenos Aires.

Luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg no se observaron reacciones adversas generales, pero algunos animales manifestaron dolor en el sitio de inyección durante las seis horas posteriores a la aplicación. La aplicación se realizó en la cara posterior del muslo –zona isquiotibial- y en un solo punto.

Luego de la aplicación, cada animal fue alojado en un brete del tambo para continuar con la toma de muestras de sangre y de leche de acuerdo con el diseño de toma de muestras del experimento. No se perdió ninguna de las muestras de sangre o leche planificadas en el diseño del ensayo.

La aplicación fue realizada por el tesista y dos operarios para el manejo de manga y sujeción de animales. La toma de muestra fue realizada por dos equipos de dos personas cada uno y una quinta persona para indicar la secuencia de muestreo y realizar el registro de datos. A partir de las 36 horas el trabajo fue realizado en cada ordeño y hasta la finalización del experimento por el tesista y un colaborador.

En las Tablas 13 y 14 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en suero de animales sanos y con mastitis respectivamente.

En las Tablas 15 y 16 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en leche de animales sanos y con mastitis respectivamente.

Las Figuras 3 y 4 muestran las curvas promedio de las concentraciones de azitromicina en suero y leche de animales sanos y con mastitis.

En la Tabla 17 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales sanos luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 18 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 19 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales sanos luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 20 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 21 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en suero de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 22 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en leche de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 23 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} , MRT y F en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

En la Tabla 24 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} , MRT y F_L en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Tabla 13: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración Intramuscular de 10 mg/kg en vacas sanas en lactación.

Animal N°	1	2	3	4	5	6	Promedio	DE
Litros día	12	9,5	13	8,5	15	12,5	11,7	2,38
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	0,660	0,760	0,392	0,320	0,616	0,430	0,530	0,173
1	0,780	0,840	0,532	0,462	0,730	0,540	0,647	0,155
2	0,970	0,960	0,655	0,570	0,840	0,870	0,811	0,164
3	0,820	1,080	0,655	0,784	0,720	0,710	0,795	0,151
4	0,640	0,990	0,840	0,756	0,690	0,580	0,749	0,149
6	0,510	0,850	0,980	0,680	0,560	0,490	0,678	0,199
8	0,460	0,740	0,890	0,610	0,450	0,410	0,593	0,191
10	0,430	0,690	0,780	0,530	0,340	0,390	0,527	0,175
12	0,410	0,600	0,700	0,500	0,320	0,290	0,470	0,161
24	0,380	0,520	0,532	0,440	0,270	0,220	0,394	0,129
36	0,320	0,450	0,500	0,370	0,230	0,200	0,345	0,119
48	0,270	0,420	0,430	0,308	0,210	0,170	0,301	0,107
60	0,250	0,310	0,360	0,252	0,160	0,150	0,247	0,082
72	0,220	0,280	0,310	0,220	0,120	0,130	0,213	0,077
84	0,180	0,160	0,224	0,180	0,100	0,120	0,161	0,045
96	0,150	0,120	0,140	0,120	0,090	0,100	0,120	0,023
108	0,090	0,090	0,084	0,080	0,080	0,080	0,084	0,005
120	0,060	0,050	0,056	0,060	0,060	0,050	0,056	0,005

Tabla 14: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración Intramuscular de 10 mg/kg en vacas con mastitis en lactación.

Animal N°	7	8	9	10	11	12	Promedio	DE
Litros día	16	10,5	10	13	11,5	14	12,50	2,28
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	0,350	0,490	0,430	0,330	0,320	0,410	0,388	0,066
1	0,550	0,560	0,540	0,660	0,480	0,580	0,562	0,059
2	0,650	0,690	0,630	0,670	0,620	0,660	0,653	0,026
3	0,710	0,530	0,590	0,590	0,550	0,525	0,583	0,069
4	0,660	0,470	0,530	0,560	0,480	0,480	0,530	0,073
6	0,570	0,425	0,480	0,450	0,410	0,370	0,451	0,069
8	0,530	0,420	0,410	0,390	0,370	0,320	0,407	0,070
10	0,480	0,370	0,380	0,330	0,310	0,270	0,357	0,073
12	0,450	0,340	0,320	0,300	0,280	0,250	0,323	0,069
24	0,330	0,280	0,280	0,270	0,230	0,190	0,263	0,048
36	0,285	0,230	0,250	0,190	0,190	0,165	0,218	0,045
48	0,200	0,190	0,210	0,170	0,170	0,140	0,180	0,025
60	0,150	0,150	0,180	0,150	0,150	0,125	0,151	0,017
72	0,120	0,120	0,140	0,130	0,130	0,110	0,125	0,010
84	0,100	0,100	0,110	0,110	0,110	0,100	0,105	0,005
96	0,090	0,090	0,090	0,090	0,100	0,100	0,093	0,005
108	0,070	0,060	0,070	0,070	0,090	0,080	0,073	0,010
120	0,060	0,050	0,050	0,060	0,060	0,060	0,057	0,005

Tabla 15: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramuscular de 10 mg/kg en vacas sanas y en lactación.

Animal N°	1	2	3	4	5	6	Promedio	DE
Litros día	12	9,5	13	8,5	15	12,5	11,7	2,38
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
2	1,000	0,740	ND	ND	ND	ND	0,290	0,457
3	1,290	1,510	ND	ND	1,090	ND	0,648	0,723
4	1,460	1,830	0,790	0,520	1,450	0,420	1,078	0,579
6	1,850	2,300	1,340	0,720	2,220	1,360	1,632	0,605
8	2,040	3,710	1,830	2,980	5,970	2,140	3,112	1,567
10	2,140	4,940	1,940	3,280	7,890	2,610	3,800	2,277
12	2,190	4,880	2,100	3,380	6,210	3,000	3,627	1,618
24	2,140	3,780	2,330	3,260	5,030	4,400	3,490	1,141
36	2,100	3,300	2,220	3,170	4,550	5,370	3,452	1,291
48	2,020	3,180	2,120	2,900	4,280	3,820	3,053	0,902
60	1,870	2,850	2,070	2,810	3,820	2,810	2,705	0,691
72	1,730	2,630	1,980	2,580	2,990	2,380	2,382	0,460
84	1,700	2,340	1,900	2,440	2,680	2,240	2,217	0,360
96	1,580	2,130	1,700	2,280	2,450	2,120	2,043	0,337
108	1,420	2,020	1,580	2,070	2,190	1,980	1,877	0,304
120	1,380	1,890	1,430	1,850	2,020	1,790	1,727	0,261

ND: No detectado

NC: No calculado

Tabla 16: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramuscular de 10 mg/kg en vacas con mastitis y en lactación.

Animal N°	7	8	9	10	11	12	Promedio	DE
Litros día	16	10,5	10	13	11,5	14	12,50	2,28
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
1	ND	ND	ND	ND	ND	0,810	0,135	0,331
2	0,440	1,000	0,430	ND	0,760	1,830	0,743	0,631
3	0,640	1,730	0,630	1,530	1,100	2,000	1,272	0,574
4	0,720	1,900	0,840	1,680	1,350	2,320	1,468	0,621
6	0,970	2,290	1,120	2,580	1,580	2,820	1,893	0,779
8	2,430	2,360	1,950	2,810	1,750	3,620	2,487	0,669
10	2,840	2,880	2,450	2,910	2,430	4,140	2,942	0,625
12	3,580	3,190	2,830	2,840	3,550	4,150	3,357	0,508
24	3,500	2,980	3,490	2,790	3,310	4,150	3,370	0,476
36	3,360	2,840	2,680	2,650	2,850	3,860	3,040	0,476
48	3,260	2,690	2,560	2,590	2,570	3,640	2,885	0,456
60	3,160	2,540	2,450	2,510	2,400	3,370	2,738	0,416
72	3,050	2,430	2,300	2,220	2,290	3,120	2,568	0,407
84	2,900	2,210	2,200	2,010	2,160	3,040	2,420	0,434
96	2,780	2,050	1,880	1,950	1,980	2,940	2,263	0,468
108	2,640	1,870	1,720	1,800	1,790	2,760	2,097	0,471
120	2,430	1,720	1,650	1,720	1,560	2,680	1,960	0,471

ND: No detectado

NC: No calculado

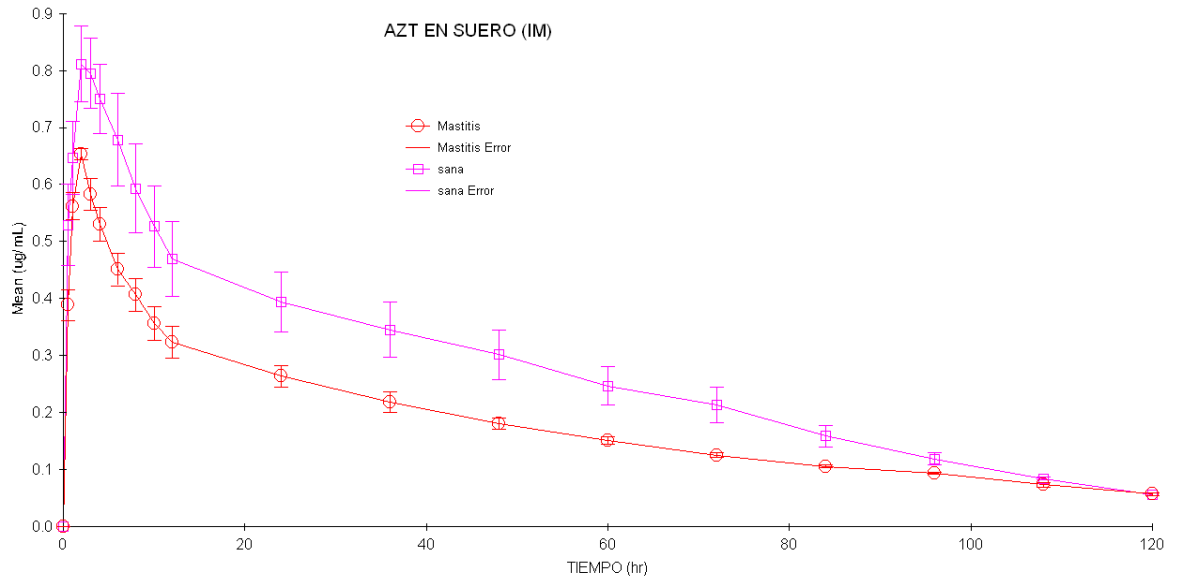


Figura 3: Concentraciones promedio de azitromicina en suero en función del tiempo, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg a seis vacas sanas y con mastitis en período de lactación.

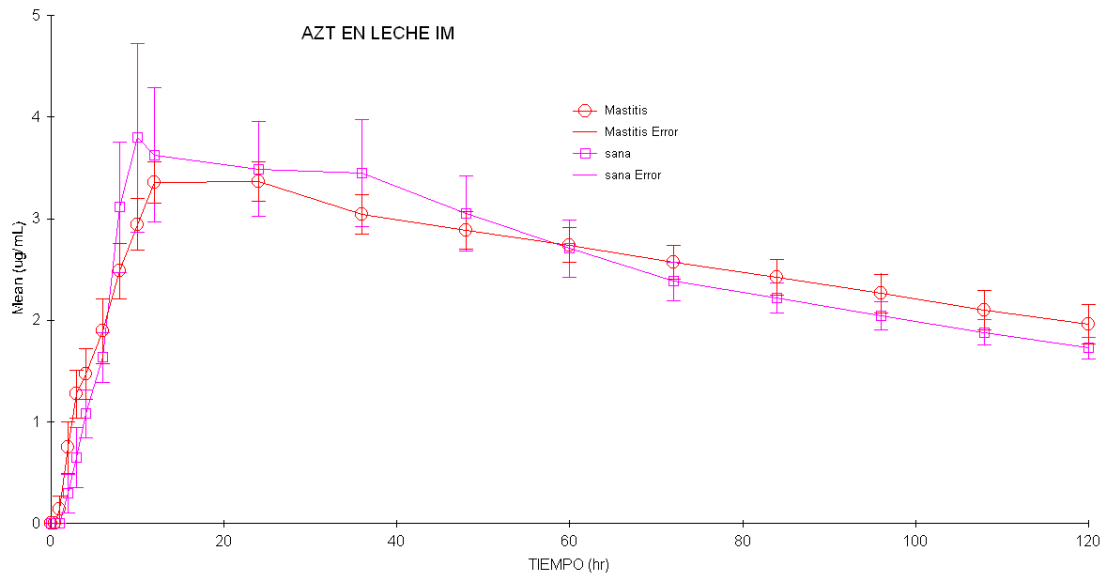


Figura 4: Concentraciones promedio de azitromicina en leche en función del tiempo, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg a seis vacas sanas y con mastitis en período de lactación.

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0,016	0,022	0,022	0,019	0,016	0,014	0,018	0,004
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	42,214	31,017	31,283	35,736	44,581	49,806	39,106	7,643
T_{max} (h)	2,000	3,000	6,000	3,000	2,000	2,000	3,000	1,549
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,970	1,080	0,980	0,780	0,840	0,870	0,920	0,110
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	32,015	41,795	44,573	34,135	23,871	22,020	33,068	9,137
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	35,669	44,032	47,280	37,228	27,730	25,613	36,259	8,594
F %	35,97	46,10	61,91	50,42	25,86	28,01	41,375	13,978
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	42,257	38,319	39,991	40,450	38,734	40,704	40,076	1,428
$MRT_{0-\infty}$ (h)	56,461	44,743	47,159	51,344	58,994	61,906	53,434	6,799

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	7	8	9	10	11	12		
λ_z (1/h)	0,018	0,018	0,017	0,015	0,012	0,011	0,015	0,003
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	38,291	39,352	40,713	47,131	57,463	60,888	47,306	9,754
T_{max} (h)	3,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,167	0,408
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,710	0,690	0,630	0,670	0,620	0,660	0,663	0,034
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	25,748	22,340	23,675	21,720	20,950	18,695	22,188	2,402
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	29,062	25,179	26,612	25,800	25,924	23,966	26,090	1,706
F %	23,05	18,76	19,70	18,21	18,06	15,36	18,856	2,511
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	37,054	39,099	40,336	40,380	42,924	42,623	40,403	2,200
$MRT_{0-\infty}$ (h)	52,815	54,621	55,610	63,722	73,619	78,959	63,224	10,920

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0,005	0,008	0,005	0,006	0,010	0,012	0,008	0,003
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	151,731	85,175	142,578	126,436	66,388	58,803	105,185	40,183
T_{max} (h)	12,000	10,000	24,000	12,000	10,000	36,000	17,333	10,558
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	2,190	4,940	2,330	3,380	7,890	5,370	4,350	2,173
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	214,870	339,155	225,485	307,620	426,895	346,030	310,009	80,013
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	516,953	571,402	519,632	645,075	620,367	497,883	561,885	60,550
F %	671,1	811,5	505,9	901,2	1788,34	1571,4	1041,573	516,760
R C_{max_L}/C_{max_S}	2,25	4,57	2,38	4,33	9,39	6,17	4,848	2,667
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	56,742	53,292	58,844	57,671	51,168	54,270	55,331	2,913
$MRT_{0-\infty}$ (h)	221,622	130,351	209,901	185,699	102,504	100,192	158,378	54,210

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 20. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedios \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	7	8	9	10	11	12		
λ_z (1/h)	0,0034	0,0056	0,007	0,005	0,0071	0,0044	0,005	0,001
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	201,97	123,81	98,78	137,26	97,38	156,50	135,954	39,495
T_{max} (h)	12	12	24	10	12	12	13,667	5,125
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3,58	3,19	3,49	2,91	3,55	4,15	3,478	0,418
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	350,08	288,61	274,43	273,09	281,81	396,76	310,799	51,011
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1058,153	595,83	509,58	613,71	500,98	1001,86	713,35	249,99
F %	1359,64	1291,89	1159,15	1257,32	1345,15	2122,28	1422,572	350,240
R C_{max_L}/C_{max_S}	5,04	4,62	5,54	4,34	5,73	6,29	5,260	0,730
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	59,87	56,21	56,58	56,37	55,63	56,92	56,935	1,501
$MRT_{0-\infty}$ (h)	295,09	181,20	151,61	201,60	145,25	231,38	201,02	56,06

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos promedios, obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas y seis con mastitis, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0,018	0,004	0,015	0,003
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	39,106	7,643	47,306	9,754
T_{max} (h)	3,000	1,549	2,167	0,408
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,920	0,110	0,663	0,034
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	33,068	9,137	22,188	2,402
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	36,259	8,594	26,090	1,706
F (%)*	41,375	13,978	18,860	2,511
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	40,076	1,428	40,403	2,200
$MRT_{0-\infty}$ (h)	53,434	6,799	63,224	10,920

$$*(AUC_{\text{sueroIM}} / AUC_{\text{sueroIV}}) \cdot 100$$

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos promedios obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas y seis con mastitis, luego de su administración intramuscular a razón de 10 mg/kg.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0,008	0,003	0,005	0,001
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	105,185	40,183	135,954	39,495
T_{max} (h)	17,333	10,558	13,667	5,125
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4,350	2,173	3,478	0,418
$R C_{max \text{ -leche}} / C_{max \text{ -suero}}$	4,848	2,667	5,260	0,730
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	310,009	80,013	310,799	51,011
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	561,885	60,550	713,357	249,994
F_L (%)*	1041,573	516,760	1422,572	350,240
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	55,331	2,913	56,935	1,501
$MRT_{0-\infty}$ (h)	158,378	54,210	201,027	56,062

$$*(AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{suero}}) \cdot 100$$

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 23. Valores obtenidos de P, luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} , MRT y F en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	33,07 ± 9,14	22,19 ± 2,40	0,0054 **
$t_{1/2\lambda}$ (h)	39,11 ± 7,64	47,31 ± 9,75	0,0114 **
C_{max} (µg/ml)	0,92 ± 0,11	0,66 ± 0,03	0,0004 ***
T_{max} (h)	3,00 ± 1,55	2,17 ± 0,41	0,1431
MRT _{0-tlast} (h)	40,07 ± 1,42	40,40 ± 2,2	0,4123
F (%)	41,38 ± 13,96	18,86 ± 2,51	0,0012 ***

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

*Diferencia significativa

** Diferencia altamente significativa

*** Diferencia muy altamente significativa

Tabla 24. Valores obtenidos de P, luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} , MRT, F_L y $R C_{maxL}/C_{maxS}$ en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	310 ± 80	310 ± 51	0,4391
$t_{1/2\lambda}$ (h)	105 ± 40	135 ± 39	0,0837
C_{max} (µg/ml)	4,35 ± 2,17	3,47 ± 0,41	0,2825
T_{max} (h)	17,33 ± 10,56	13,7 ± 5,13	0,2369
MRT _{0-tlast} (h)	55,33 ± 2,91	56,93 ± 1,5	0,0993
F_L (%)	1041,57 ± 516,76	1422,57 ± 350,24	0,0289 *
RC_{maxL}/C_{maxS}	4,85 ± 2,67	5,26 ± 0,73	0,1982

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

VI. 3. RESULTADOS DEL ENSAYO INTRAMAMARIO CON VACAS EN LACTANCIA

El ensayo intramamario en vacas en lactancia fue realizado en el establecimiento “El Recreo” ubicado en el partido de Brandsen, provincia de Buenos Aires.

La selección de los animales se realizó siguiendo la misma metodología que se efectuó en los ensayos intravenoso e intramuscular .

La aplicación del antimicrobiano se realizó en cada cuarto mamario durante tres ordeñes consecutivos y sin ninguna dificultad. Luego de la administración intramamaria de azitromicina a la dosis de 125 mg por cuarto mamario no se observaron reacciones adversas locales o generales.

Posteriormente a la dosificación, cada animal fue alojado en un brete del tambo para continuar con la toma de muestras de sangre y de leche de acuerdo con el diseño de toma de muestras del experimento. Solo se perdieron dos muestras de leche, las cuales figuran como SM (sin muestra) en las tablas de concentraciones correspondientes.

La aplicación fue realizada por el tesista y dos operarios para el manejo de manga y sujeción de animales. La toma de muestra fue realizada por dos equipos de dos personas cada uno y una quinta persona para indicar la secuencia de muestreo y realizar el registro de datos. A partir de las 36 horas el trabajo fue realizado en cada ordeño y hasta la finalización del experimento por el tesista y un colaborador.

En las Tablas 25 y 26 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en suero de animales sanos y con mastitis respectivamente.

En las Tablas 27 y 28 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en leche de animales sanos y con mastitis respectivamente.

Las Figuras 5 y 6 muestran las curvas promedio de las concentraciones de azitromicina en suero y leche de animales sanos y con mastitis.

En la Tabla 29 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales sanos luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 30 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales con mastitis luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 31 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales sanos luego del análisis no-compartmental.

En la Tabla 32 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 33 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en suero de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 34 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en leche de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 35 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

En la Tabla 36 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, y MRT en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Tabla 25: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intramamaria de 125 mg por cuarto mamario, durante tres ordeñes consecutivos, en vacas sanas en lactación.

Animal N° Litros día		1	2	3	4	5	6	Promedio	DE
Muestra	Tiempo (h)	10,5 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	8,2 $\mu\text{g/ml}$	10,4 $\mu\text{g/ml}$	11 $\mu\text{g/ml}$	13 $\mu\text{g/ml}$	10,18 $\mu\text{g/ml}$	1,868 $\mu\text{g/ml}$
I 0.5hs	0,5	0,240	0,120	0,180	0,150	0,140	ND	0,138	0,080
I 1hs	1	0,170	0,150	0,200	0,130	0,160	ND	0,135	0,070
I 2hs	2	0,130	0,160	0,140	0,120	0,130	0,100	0,130	0,020
I 3hs	3	0,100	0,120	0,160	0,100	0,130	0,100	0,118	0,024
I 4hs	4	0,100	ND	0,140	0,100	0,110	0,100	0,092	0,048
I 6hs	6	ND	ND	0,100	ND	0,110	0,100	0,052	0,057
I 8hs	8	ND	ND	0,100	ND	0,100	ND	0,033	0,052
II 0.5hs	10,5	0,210	0,200	0,250	0,190	0,230	0,220	0,217	0,022
II 1hs	11	0,180	0,210	0,220	0,195	0,220	0,120	0,191	0,038
II 2hs	12	0,140	0,150	0,240	0,150	0,180	0,090	0,158	0,050
II 3hs	13	0,110	0,130	0,220	0,140	0,140	0,090	0,138	0,044
II 4hs	14	0,105	0,120	0,180	0,100	0,120	0,080	0,118	0,034
II 6hs	16	0,100	0,100	0,140	0,100	0,130	0,080	0,108	0,022
II 10hs	20	ND	0,100	0,100	0,100	0,110	0,080	0,082	0,041
II 12hs	22	ND	ND	0,100	ND	ND	0,080	0,030	0,047
III 0.5hs	22,5	0,160	0,270	0,220	2,000	0,200	0,400	0,542	0,719
III 1hs	23	0,170	0,200	0,240	0,130	0,210	0,470	0,237	0,120
III 2hs	24	0,150	0,170	0,200	0,140	0,200	0,200	0,177	0,027
III 3hs	25	0,130	0,140	0,170	0,120	0,150	0,160	0,145	0,019
III 4hs	26	0,120	0,110	0,180	0,100	0,170	0,130	0,135	0,033
III 6hs	28	0,120	0,110	0,170	0,090	0,170	0,180	0,140	0,038
III 8hs	30	ND	0,100	0,150	0,060	0,150	0,140	0,120	0,039
III 10hs	32	ND	ND	0,150	ND	0,130	0,120	0,133	0,015
24hs	46	ND	ND	0,110	ND	ND	ND	0,110	NC
36hs	58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC

ND: No detectado

NC: No calculado

Tabla 26: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intramamaria de 125 mg por cuarto mamario, durante tres ordeñes consecutivos, en vacas con mastitis en lactación.

Animal N° Litros día		7	8	9	10	11	12	Promedio	DE
Muestra	Tiempo (h)	8,2 $\mu\text{g/ml}$	8,4 $\mu\text{g/ml}$	12 $\mu\text{g/ml}$	14 $\mu\text{g/ml}$	14,5 $\mu\text{g/ml}$	12,5 $\mu\text{g/ml}$	11,60 $\mu\text{g/ml}$	2,718 $\mu\text{g/ml}$
I 0.5hs	0,5	0,180	0,140	0,170	0,140	0,180	0,190	0,167	0,022
I 1hs	1	0,140	0,150	0,200	0,160	0,200	0,160	0,168	0,026
I 2hs	2	0,110	0,110	0,150	0,120	0,190	0,140	0,137	0,031
I 3hs	3	0,090	0,080	0,110	0,100	0,150	0,140	0,112	0,028
I 4hs	4	0,090	0,080	0,110	0,080	0,120	0,090	0,095	0,016
I 6hs	6	0,090	ND	0,080	0,080	0,120	0,080	0,075	0,040
I 8hs	8	0,080	ND	0,070	0,070	0,100	0,080	0,067	0,034
II 0.5hs	10,5	0,110	0,090	0,150	0,160	0,180	0,140	0,138	0,033
II 1hs	11	0,140	0,100	0,180	0,180	0,180	0,140	0,153	0,033
II 2hs	12	0,090	0,090	0,200	0,110	0,210	0,110	0,135	0,055
II 3hs	13	0,100	0,080	0,130	0,100	0,140	0,120	0,112	0,022
II 4hs	14	0,090	ND	0,080	0,080	0,110	0,080	0,073	0,038
II 6hs	16	0,100	ND	0,070	0,070	0,120	0,100	0,077	0,042
II 10hs	20	0,090	ND	0,140	0,070	0,120	0,090	0,085	0,048
II 12hs	22	0,080	ND	0,080	ND	0,080	0,080	0,053	0,041
III 0.5hs	22,5	0,080	0,120	0,120	0,140	0,140	0,070	0,112	0,030
III 1hs	23	0,120	0,100	0,110	0,140	0,140	0,160	0,128	0,022
III 2hs	24	0,100	0,100	0,110	0,120	0,120	0,150	0,117	0,019
III 3hs	25	0,090	0,090	0,100	0,090	0,100	0,120	0,098	0,012
III 4hs	26	0,070	0,090	0,090	0,100	0,090	0,100	0,090	0,011
III 6hs	28	0,070	0,090	0,080	0,090	0,090	0,080	0,083	0,008
III 8hs	30	0,060	0,080	0,070	0,090	0,080	0,080	0,077	0,010
III 10hs	32	0,050	0,070	ND	0,070	ND	0,050	0,060	0,012
24hs	46	0,050	ND	ND	0,070	ND	0,050	0,057	0,012
36hs	58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC

ND: No detectado

NC: No calculado

Tabla 27: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramamaria de 125 mg por cuarto mamario, durante tres ordeñes consecutivos, en vacas sanas en lactación.

Animal N° Litros día		1	2	3	4	5	6	Promedio	DE
Muestra	Tiempo (h)	10,5 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	8,2 $\mu\text{g/ml}$	10,4 $\mu\text{g/ml}$	11 $\mu\text{g/ml}$	13 $\mu\text{g/ml}$	10,18 $\mu\text{g/ml}$	1,868 $\mu\text{g/ml}$
I 1hs	1	10,640	9,770	10,280	10,640	11,400	6,370	9,850	1,786
I 2hs	2	5,370	7,430	7,290	6,930	9,770	5,370	7,027	1,628
I 4hs	4	3,100	4,600	4,300	4,300	6,150	4,520	4,495	0,977
I 6hs	6	3,100	3,780	4,300	3,380	4,920	3,740	3,870	0,655
I 8hs	8	2,280	2,660	3,270	3,100	4,110	3,150	3,095	0,619
I 10hs	10	2,280	2,160	3,210	3,000	3,910	2,840	2,900	0,642
II 1hs	11	14,000	16,600	27,290	17,180	14,720	10,640	16,738	5,662
II 2hs	12	8,510	9,770	13,300	13,770	7,300	6,930	9,930	2,969
II 4hs	14	4,840	5,460	6,100	10,840	5,100	5,140	6,247	2,292
II 6hs	16	4,360	4,520	5,940	9,290	4,520	4,840	5,578	1,907
II 10hs	20	3,500	4,680	4,630	6,150	3,680	3,770	4,402	0,992
II 12hs	22	3,040	4,360	4,610	5,550	3,000	3,560	4,020	1,002
III 1hs	23	20,040	16,330	16,330	21,880	13,300	10,640	16,420	4,149
III 2hs	24	13,060	13,060	11,120	18,400	10,640	6,930	12,202	3,776
III 4hs	26	10,470	9,770	11,110	15,520	7,060	5,370	9,883	3,521
III 6hs	28	8,510	6,590	5,560	8,970	5,940	3,500	6,512	2,017
III 8hs	30	7,180	4,210	5,190	9,770	4,680	2,520	5,592	2,542
III 10hs	32	6,270	4,000	3,150	8,810	3,870	2,480	4,763	2,360
24hs	46	2,400	2,400	2,160	2,890	3,100	2,090	2,507	0,404
36hs	58	2,040	2,770	2,090	2,090	2,610	1,890	2,248	0,354
48hs	70	1,490	1,730	SM	1,590	2,090	2,400	1,860	0,378
60hs	82	1,320	1,620	2,240	1,390	1,920	2,090	1,763	0,378
72hs	94	1,490	1,320	1,760	1,540	1,360	1,950	1,570	0,243
84hs	106	1,360	1,150	1,270	1,210	1,210	1,210	1,235	0,072
96hs	118	1,220	1,040	1,090	1,110	0,750	0,970	1,030	0,160
108hs	130	0,750	0,690	1,040	0,850	0,820	0,890	0,840	0,121
120hs	142	1,110	0,630	0,940	0,670	0,630	0,910	0,815	0,201
144hs	166	0,890	0,630	0,800	0,630	0,630	1,000	0,763	0,159

SM: Sin muestra

Tabla 28: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramamaria de 125 mg por cuarto mamario, durante tres ordeñes consecutivos, en vacas con mastitis en lactación.

Animal N° Litros día		7	8	9	10	11	12	Promedio	DE
Muestra	Tiempo (h)	8,2 $\mu\text{g/ml}$	8,4 $\mu\text{g/ml}$	12 $\mu\text{g/ml}$	14 $\mu\text{g/ml}$	14,5 $\mu\text{g/ml}$	12,5 $\mu\text{g/ml}$	11,60 $\mu\text{g/ml}$	2,718 $\mu\text{g/ml}$
I 1hs	1	44,360	19,500	109,650	48,500	34,500	90,900	57,902	34,816
I 2hs	2	19,450	10,720	42,660	22,000	18,120	48,450	26,900	15,041
I 4hs	4	3,560	7,240	9,120	12,000	14,320	23,220	11,577	6,817
I 6hs	6	2,200	4,680	6,610	4,500	7,560	18,140	7,282	5,635
I 8hs	8	8,450	3,390	5,370	5,000	4,450	9,990	6,108	2,548
I 10hs	10	9,930	3,240	SM	5,000	4,040	7,330	5,908	2,722
II 1hs	11	127,050	22,390	81,280	94,000	29,900	94,330	74,825	40,706
II 2hs	12	52,480	12,300	57,540	55,000	19,500	67,800	44,103	22,573
II 4hs	14	48,970	7,410	26,920	48,700	15,150	37,550	30,783	17,339
II 6hs	16	36,560	5,890	16,980	42,350	9,090	19,890	21,793	14,709
II 10hs	20	21,880	3,800	11,750	33,500	7,560	15,340	15,638	10,757
II 12hs	22	18,860	3,720	10,960	28,440	4,340	13,140	13,243	9,356
III 1hs	23	88,510	14,450	123,030	124,500	38,600	101,340	81,738	45,502
III 2hs	24	132,430	34,670	77,620	98,330	35,050	88,780	77,813	37,985
III 4hs	26	53,830	12,300	35,480	70,900	29,890	64,450	44,475	22,422
III 6hs	28	40,090	7,080	30,900	68,330	19,000	38,500	33,983	20,953
III 8hs	30	34,510	4,900	16,220	40,400	22,890	22,400	23,553	12,707
III 10hs	32	22,650	7,940	13,180	26,870	17,500	13,450	16,932	6,911
24hs	46	7,830	3,020	9,330	14,100	9,760	10,540	9,097	3,637
36hs	58	4,900	2,450	6,760	8,760	5,800	7,230	5,983	2,171
48hs	70	2,550	3,390	4,900	3,570	4,930	5,400	4,123	1,114
60hs	82	2,770	3,160	3,720	2,580	3,340	4,300	3,312	0,632
72hs	94	3,690	2,570	3,240	2,240	2,780	3,990	3,085	0,675
84hs	106	2,500	2,240	2,820	2,330	2,560	3,540	2,665	0,473
96hs	118	1,950	1,620	1,740	2,090	1,600	2,860	1,977	0,473
108hs	130	1,610	1,030	1,700	1,880	1,120	1,570	1,485	0,336
120hs	142	1,540	1,550	1,620	1,200	1,140	1,460	1,418	0,200
144hs	166	0,980	1,620	1,410	0,800	0,890	0,950	1,108	0,328

SM: Sin muestra

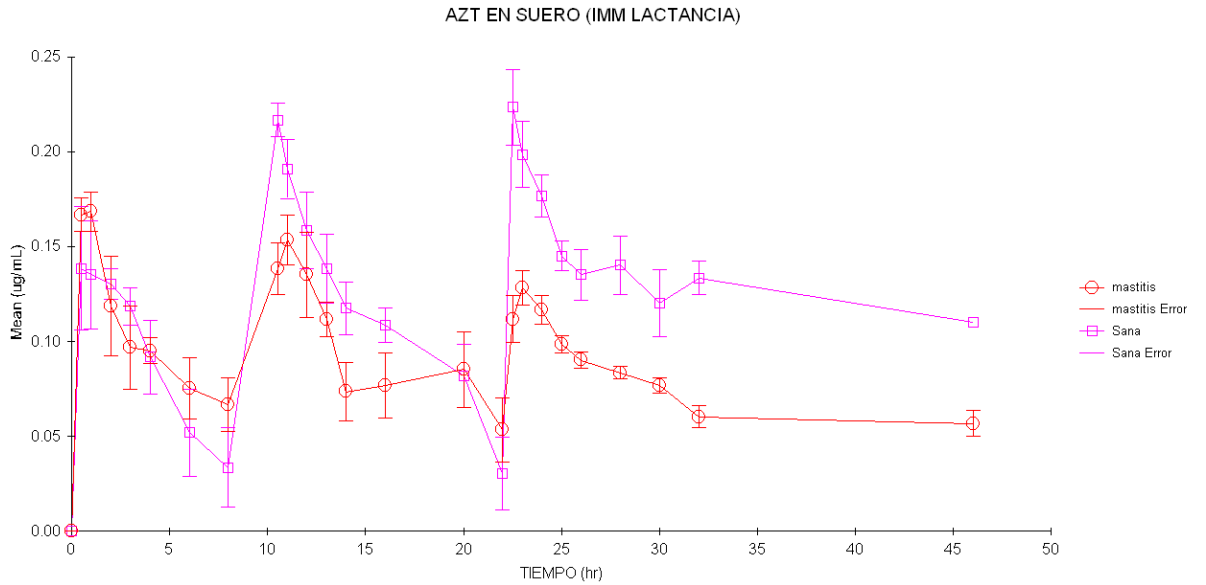


Figura 5: Concentraciones promedio de azitromicina en suero en función del tiempo, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos a seis vacas sanas y seis con mastitis en período de lactación.

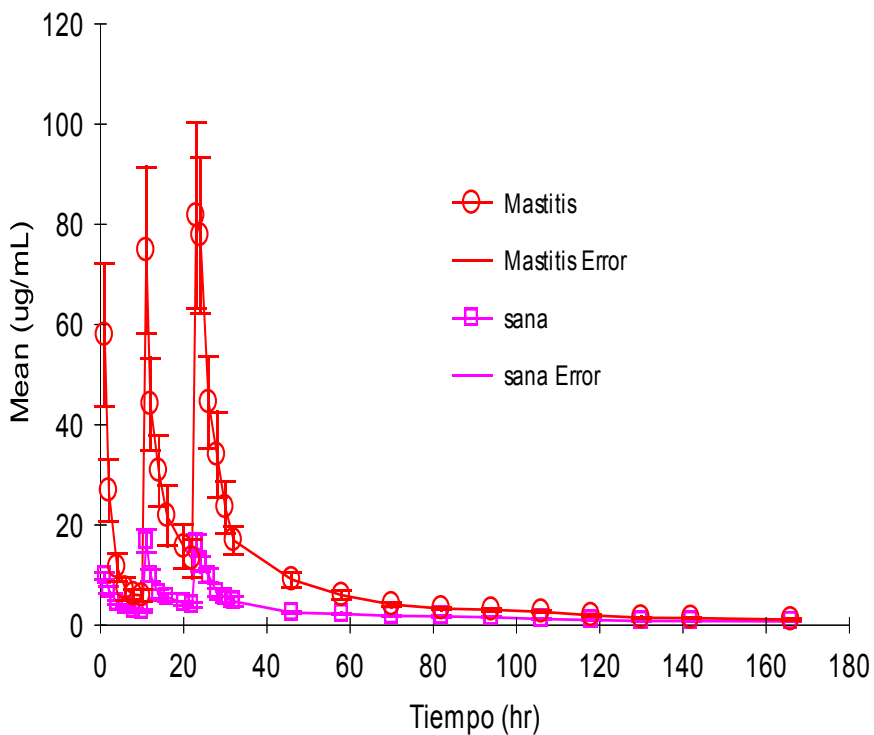


Figura 6: Concentraciones promedio de azitromicina en leche en función del tiempo, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos a seis vacas sanas y seis con mastitis en período de lactación.

Tabla 29. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos. Análisis realizado a partir de la última aplicación intramamaria.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0,071	0,121	0,028	0,132	0,044	0,074	0,078	0,041
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	9,770	5,722	24,461	5,234	15,942	9,425	11,759	7,311
T_{max} (h)	23,000	22,500	23,000	22,500	23,000	22,500	22,750	0,274
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,170	0,270	0,240	0,200	0,210	0,290	0,230	0,045
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	0,788	1,080	3,565	0,848	1,633	1,660	1,595	1,036
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	2,479	1,906	7,447	1,301	4,622	3,292	3,508	2,250
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	2,918	3,479	10,419	3,478	4,789	4,526	4,935	2,778
$MRT_{0-\infty}$ (h)	14,638	9,014	35,894	7,684	23,036	13,980	17,374	10,563
F (%)	0,881	1,190	4,951	1,252	1,772	2,111	2,031	1,502

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 30. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos. Análisis realizado a partir de la última aplicación intramamaria.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	7	8	9	10	11	12		
λ_z (1/h)	0,0337	0,0436	0,0706	0,0247	0,0774	0,0499	0,050	0,021
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	20,5764	15,893	9,8114	28,0833	8,9554	13,8839	16,201	7,199
T_{max} (h)	23	22,5	22,5	22,5	22,5	23	22,667	0,258
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,12	0,12	0,12	0,14	0,14	0,16	0,133	0,016
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1,455	0,87	0,7375	1,945	0,81	1,665	1,247	0,509
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	2,9393	2,475	1,7283	4,7811	1,8436	2,6665	2,739	1,105
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	10,4467	4,7989	3,6508	10,8638	3,6296	9,6321	7,170	3,492
$MRT_{0-\infty}$ (h)	32,2814	23,0408	14,2591	42,6895	13,3232	22,5517	24,691	11,197
F (%)	1,301	0,730	0,616	1,632	0,701	1,375	1,062	0,431

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeños consecutivos. Análisis realizado a partir de la última aplicación intramamaria.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	1	2	3	4	5	6		
λ_z (1/h)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	68.83	60.01	48.39	78.60	56.71	45.50	59.67	12.48
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	451.47	434.21	411.73	363.77	532.45	417.80	435.24	56.00
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	530.91	511.27	455.72	477.16	584.00	459.15	503.03	49.47
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	48.66	49.36	46.43	56.00	41.85	46.68	48.16	4.65
$MRT_{0-\infty}$ (h)	81.08	79.99	64.71	109.08	60.03	63.33	76.37	18.32

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 32. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos. Análisis realizado a partir de la última aplicación intramamaria.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	7	8	9	10	11	12		
λ_z (1/h)	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	47.35	31.43	35.43	39.54	39.28	88.06	46.85	20.87
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1781.40	1097.53	1873.26	1740.81	2071.69	641.76	1534.41	546.77
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1848.35	1137.88	1921.82	1821.25	2117.02	847.58	1615.65	501.94
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	33.13	41.53	33.94	32.67	32.88	51.15	37.55	7.47
$MRT_{0-\infty}$ (h)	40.42	47.55	38.57	41.08	36.94	109.89	52.41	28.39

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 33. Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de vacas sanas y con mastitis, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0,078	0,041	0,050	0,021
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	11,759	7,311	16,201	7,199
T_{max} (h)	22,750	0,274	22,667	0,258
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,230	0,045	0,133	0,016
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1,595	1,036	1,247	0,509
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	3,508	2,250	2,739	1,105
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	4,935	2,778	7,170	3,492
$MRT_{0-\infty}$ (h)	17,374	10,563	24,691	11,197
F (%)	2,031	1,502	1,062	0,431

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 34. Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche de vacas sanas y con mastitis, luego de su administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto, durante tres ordeñes consecutivos.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0.01	0.00	0.02	0.00
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	59.67	12.48	46.85	20.87
AUC _{0-t_{last}} (h. $\mu\text{g/ml}$)	435.24	56.00	1534.41	546.77
AUC _{0-∞} (h. $\mu\text{g/ml}$)	503.03	49.47	1615.65	501.94
MRT _{0-t_{last}} (h)	48.16	4.65	37.55	7.47
MRT _{0-∞} (h)	76.37	18.32	52.41	28.39

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 35. Valores obtenidos de P, luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2}$, C_{max} , T_{max} y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	1,59 ± 1,03	1,25 ± 0,51	0,3246
$t_{1/2}$ (h)	11,76 ± 7,31	16,2 ± 7,20	0,1874
C_{max} (µg/ml)	0,23 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,0005***
T_{max} (h)	22,75 ± 0,27	22,7 ± 0,26	0,3054
MRT _{0-tlast} (h)	4,93 ± 2,78	7,17 ± 3,49	0,1840

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

*Diferencia significativa

** Diferencia altamente significativa

*** Diferencia muy altamente significativa

Tabla 36. Valores obtenidos de P, luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2}$, C_{max} , T_{max} y MRT en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanas	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	435,24 ± 56,00	1534,41 ± 546,77	0,0006 ***
$t_{1/2}$ (h)	59,67 ± 12,48	46,85 ± 20,87	0,1050
MRT _{0-tlast} (h)	48,16 ± 4,65	37,55 ± 7,47	0,0153*

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

VI 4. RESULTADOS DEL ENSAYO INTRAMAMARIO AL MOMENTO DE SECADO

El ensayo intramamario al momento de secado fue realizado en el establecimiento “El Placer” ubicado en Bavio, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires.

La selección de los animales se realizó siguiendo la misma metodología explicada en los ensayos anteriores. La aplicación de azitromicina se realizó en cada cuarto luego del último ordeño de la lactación, momento conocido como secado. La dosificación se realizó sin ninguna dificultad y luego de la administración intramamaria de azitromicina a la dosis de 250 mg por cuarto no se observaron reacciones adversas locales o generales.

Posteriormente a la aplicación, cada animal fue alojado en un brete del tambo para continuar con la toma de muestras de sangre y de leche de acuerdo con el diseño de toma de muestras del experimento. No se perdió ninguna de las muestras de sangre o leche planificadas en el diseño del ensayo.

La aplicación fue realizada por el tesista y dos operarios para el manejo de manga y sujeción de animales. La toma de muestras fue realizada por dos equipos de dos personas cada uno y una quinta persona para indicar la secuencia de muestreo y realizar el registro de datos. A partir de las 8 horas pos-tratamiento el trabajo se continuó en la manga y los animales fueron alojados en un piquete contiguo para las siguientes obtenciones de muestras.

En las Tablas 37 y 38 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en suero de animales sanos y con mastitis respectivamente.

En las Tablas 39 y 40 se presentan las concentraciones individuales y promedio alcanzadas en leche de animales sanos y con mastitis respectivamente.

Las Figuras 7 y 8 muestran las curvas promedio de las concentraciones de azitromicina en suero y leche de animales sanos y con mastitis.

En la Tabla 41 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales sanos luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 42 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en suero de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 43 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales sanos luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 44 se presentan los parámetros farmacocinéticos individuales y promedio obtenidos en leche de animales con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 45 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en suero de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 46 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos en leche de animales sanos y con mastitis luego del análisis no-compartimental.

En la Tabla 47 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

En la Tabla 48 se ven los valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2\lambda}$, y MRT en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Tabla 37: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intramamaria en vacas sanas de 250 mg por cuarto al momento de secado.

Animal N°	861	712	587	631	626	635	Promedio	DE
Litros día	8	21,4	25,5	11,6	14,3	16,7	16,25	6,415
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	0,200	0,150	0,195	0,140	0,080	0,084	0,142	0,052
1	0,190	0,160	0,210	0,190	0,140	0,370	0,210	0,082
2	0,170	0,120	0,240	0,120	0,180	0,295	0,188	0,069
3	0,160	0,120	0,220	0,130	0,160	0,220	0,168	0,043
4	0,150	0,110	0,225	0,110	0,140	0,190	0,154	0,046
6	0,130	0,110	0,230	0,100	0,120	0,130	0,137	0,047
8	0,100	0,100	0,190	0,090	0,110	0,120	0,118	0,037
10	0,100	0,090	0,130	0,080	0,090	0,100	0,098	0,017
12	0,090	0,080	0,120	0,070	0,080	0,090	0,088	0,017
24	0,080	0,080	0,110	0,060	0,060	0,080	0,078	0,018
36	0,070	0,060	0,100	0,060	ND	0,060	0,070	0,017
48	ND	ND	0,070	ND	ND	ND	0,070	NC
60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
108	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
120	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
132	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
144	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC

ND: No detectado

NC: No calculado

Tabla 38: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración intramamaria en vacas con mastitis de 250 mg por cuarto al momento de secado.

Animal N°	241	334	676	655	777	276	Promedio	DE
Litros día	12,3	17,4	22	19,5	15,7	18,2	17,52	3,317
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0,5	ND	ND	0,050	0,110	0,230	0,590	0,163	0,226
1	0,050	0,120	0,080	0,100	0,190	0,310	0,142	0,095
2	0,060	0,130	0,070	0,090	0,140	0,180	0,112	0,046
3	0,050	0,120	0,110	0,080	0,120	0,180	0,110	0,044
4	0,070	0,120	0,080	0,070	0,100	0,150	0,098	0,032
6	0,110	0,100	0,060	0,060	0,090	0,140	0,093	0,031
8	0,060	0,100	0,055	0,060	0,090	0,110	0,079	0,024
10	0,050	0,090	0,050	0,050	0,080	0,090	0,068	0,020
12	0,050	0,050	0,050	0,050	0,070	0,080	0,058	0,013
24	ND	ND	ND	ND	0,050	0,060	0,055	0,007
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
48	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
108	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
120	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
132	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC
144	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC

ND: No detectado

NC: No calculado

Tabla 39: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramamaria en vacas sanas de 250 mg por cuarto al momento de secado.

Animal N°	861	712	587	631	626	635	Promedio	DE
Litros día	8	21,4	25,5	11,6	14,3	16,7	16,25	6,415
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
1	72,940	38,020	58,200	27,160	48,970	33,110	46,400	17,130
2	52,000	34,670	43,700	13,390	20,410	13,490	29,610	16,328
4	32,580	26,060	43,700	10,280	19,050	14,450	24,353	12,403
6	13,210	14,620	17,000	6,430	16,210	9,120	12,765	4,168
8	13,330	13,650	12,900	5,750	12,580	7,240	10,908	3,470
10	13,330	9,860	12,700	6,380	10,000	7,760	10,005	2,703
12	13,000	9,330	10,500	5,440	8,510	6,600	8,897	2,719
24	6,440	5,700	7,100	3,870	6,450	5,890	5,908	1,113
36	7,530	5,160	5,400	2,800	5,750	5,500	5,357	1,515
48	6,380	3,930	3,400	2,610	4,460	4,150	4,155	1,269
60	5,610	3,390	3,000	2,370	3,310	3,780	3,577	1,102
72	4,970	3,480	2,800	2,250	3,300	3,700	3,417	0,922
84	4,800	3,250	2,500	2,270	3,140	3,260	3,203	0,886
96	4,480	3,140	3,400	2,180	3,280	3,320	3,300	0,733
108	3,700	2,720	2,100	1,490	2,300	2,700	2,502	0,741
120	3,330	2,610	2,600	1,960	1,900	2,780	2,530	0,536
132	3,220	2,790	2,600	1,720	1,900	2,700	2,488	0,569
144	3,130	2,820	2,500	1,800	1,700	2,500	2,408	0,562

Tabla 40: Concentraciones individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina en leche luego de la administración intramamaria en vacas con mastitis de 250 mg por cuarto al momento de secado.

Animal N°	241	334	676	655	777	276	Promedio	DE
Litros día	12,3	17,4	22	19,5	15,7	18,2	17,52	3,317
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
1	28,180	9,770	66,060	12,020	47,860	115,340	46,538	39,992
2	23,980	9,540	25,700	11,740	45,710	69,180	30,975	22,729
4	13,800	6,600	19,490	10,000	19,270	37,150	17,718	10,786
6	11,480	6,910	14,790	6,450	14,790	19,500	12,320	5,063
8	8,510	5,010	14,450	6,760	15,670	17,300	11,283	5,157
10	7,580	4,780	9,770	5,370	12,680	14,320	9,083	3,883
12	9,770	4,670	9,120	5,370	6,170	15,240	8,390	3,931
24	7,240	4,360	7,580	5,240	5,610	11,040	6,845	2,390
36	5,010	3,800	6,020	3,980	4,600	5,260	4,778	0,831
48	4,360	3,160	4,300	4,000	3,720	4,740	4,047	0,555
60	3,710	3,540	3,600	3,350	3,470	3,930	3,600	0,202
72	3,650	3,450	3,700	3,400	3,400	3,800	3,567	0,172
84	3,400	3,200	3,400	3,330	3,160	3,330	3,303	0,101
96	2,900	3,110	3,150	3,140	2,860	3,050	3,035	0,126
108	2,700	3,000	3,000	2,900	2,740	2,870	2,868	0,127
120	2,300	2,650	2,690	2,450	2,620	2,380	2,515	0,160
132	2,150	2,430	2,450	2,150	2,580	2,060	2,303	0,210
144	2,000	2,110	2,150	2,040	2,540	2,050	2,148	0,199

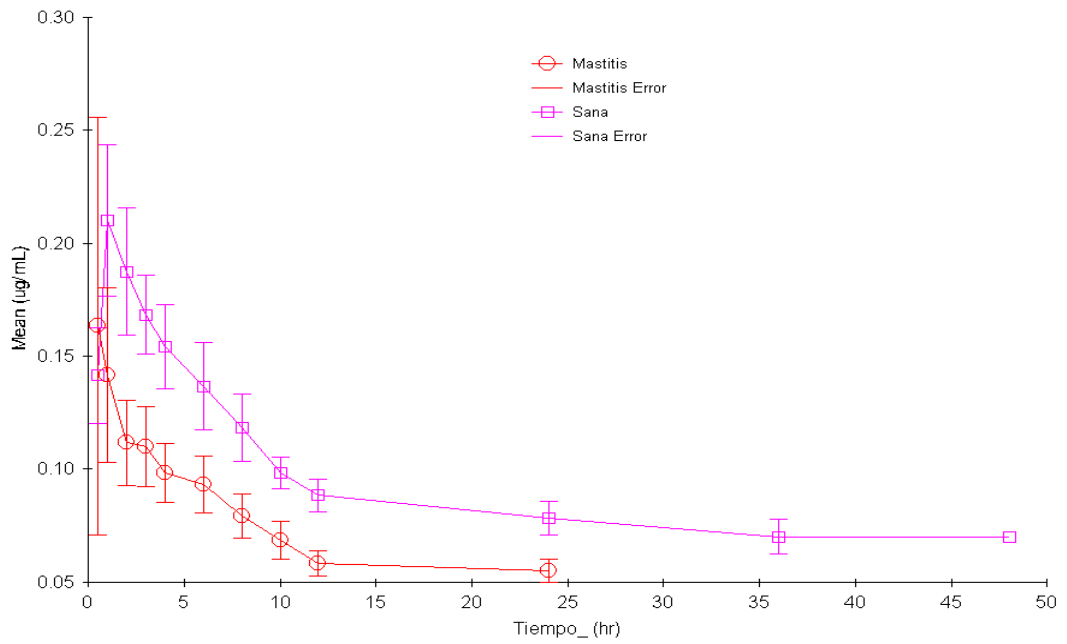


Figura 7: Concentraciones promedio de azitromicina en suero en función del tiempo, luego de su administración intramamaria a razón de 250 mg por cuarto, a seis vacas sanas y seis con mastitis en el momento de secado.

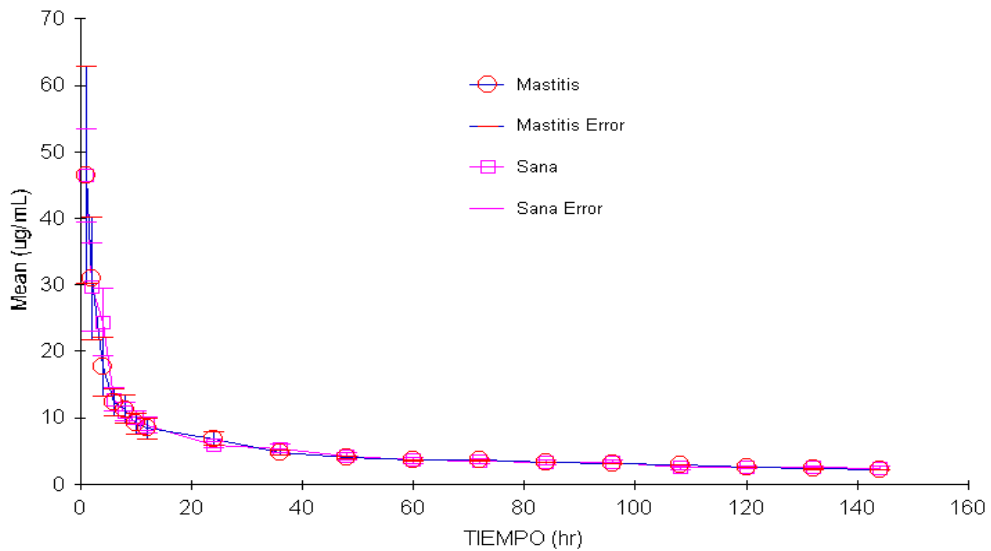


Figura 8: Concentraciones promedio de azitromicina en leche en función del tiempo, luego de su administración intramamaria a razón de 250 mg por cuarto, a seis vacas sanas y seis con mastitis en el momento de secado.

Tabla 41. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas sanas, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	587	626	631	635	712	861		
λ_z (1/h)	0,01	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	48,75	18,75	32,58	30,09	45,62	32,60	34,73	10,96
T_{max} (h)	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,25	0,61
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,24	0,18	0,19	0,37	0,16	0,20	0,22	0,08
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	5,91	2,25	2,73	3,75	3,07	3,46	3,53	1,28
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	10,84	3,87	5,55	6,36	7,02	6,76	6,73	2,31
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	19,77	10,05	15,40	13,94	16,01	15,38	15,09	3,15
$MRT_{0-\infty}$ (h)	64,54	27,24	49,73	40,76	64,26	48,36	49,15	14,26
F (%)	6,64	2,48	3,79	5,54	3,33	4,40	4,36	1,52

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 42. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	241	276	334	655	676	777		
λ_z (1/h)	0,13	0,05	0,09	0,07	0,10	0,04	0,08	0,03
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	5,44	13,07	7,47	10,32	6,64	18,12	10,18	4,77
T_{max} (h)	6,00	0,50	2,00	0,50	3,00	0,50	2,08	2,18
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,11	0,59	0,13	0,11	0,11	0,23	0,21	0,19
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	0,74	2,69	1,15	0,79	0,76	1,97	1,35	0,81
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1,13	3,82	1,68	1,54	1,24	3,28	2,12	1,14
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	6,25	8,63	5,79	5,33	5,55	9,67	6,87	1,82
$MRT_{0-\infty}$ (h)	10,98	18,76	11,22	15,77	11,74	25,82	15,71	5,83
F (%)	0,66	2,26	0,96	0,66	0,65	1,62	1,14	0,67

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 43. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas sanas, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	587	626	631	635	712	861		
λ_z (1/h)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	131.37	66.13	116.04	109.20	138.39	84.46	107.60	27.72
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	841.81	753.26	461.43	685.68	755.52	1062.30	760.00	196.37
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	1296.66	915.44	762.78	1079.52	1318.55	1443.69	1136.11	262.66
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	38.13	40.96	47.58	50.40	45.45	43.99	44.42	4.44
$MRT_{0-\infty}$ (h)	141.75	76.12	151.81	142.02	172.79	102.60	131.18	35.31

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

|

Tabla 44. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm desvío estándar obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche obtenidas de seis vacas con mastitis, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Animales (ID)						Promedio	DE
	241	276	334	655	676	777		
λ_z (1/h)	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	82.34	61.09	143.41	103.59	89.31	114.77	99.09	28.46
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	692.88	1122.82	513.43	550.05	861.93	741.85	747.16	223.94
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	930.46	1303.50	949.97	854.94	1138.96	1162.42	1056.71	171.40
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	47.27	32.33	60.72	56.69	40.93	44.22	47.03	10.41
$MRT_{0-\infty}$ (h)	102.30	60.03	194.06	141.12	97.34	140.23	122.51	46.32

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 45. Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en suero de vacas sanas y con mastitis, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0,02	0,01	0,08	0,03
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	34,73	10,96	10,18	4,77
T_{max} (h)	1,25	0,61	2,08	2,18
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,22	0,08	0,21	0,19
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	3,53	1,28	1,35	0,81
$AUC_{0-\infty}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	6,73	2,31	2,12	1,14
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)	15,09	3,15	6,87	1,82
$MRT_{0-\infty}$ (h)	49,15	14,26	15,71	5,83
F (%)	4,36	1,52	1,14	0,67

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 46. Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos por análisis farmacocinético no compartimental sobre concentraciones de azitromicina en leche de vacas sanas y con mastitis, luego de la administración intramamaria de 250 mg por cuarto, al momento de secado.

Parámetros	Promedio Sanas	DE	Promedio Mastitis	DE
λ_z (1/h)	0.01	0.00	0.01	0.00
$t_{1/2}\lambda_z$ (h)	107.60	27.72	99.09	28.46
AUC _{0-tlast} (h. $\mu\text{g/ml}$)	760.00	196.37	747.16	223.94
AUC _{0-∞} (h. $\mu\text{g/ml}$)	1136.11	262.66	1056.71	171.40
MRT _{0-tlast} (h)	44.42	4.44	47.03	10.41
MRT _{0-∞} (h)	131.18	35.31	122.51	46.32

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

Tabla 47. Valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2}$, C_{max} , T_{max} y MRT en suero de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanos	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	3,53 ± 1,28	1,35 ± 0,81	0,0120 **
$t_{1/2}$ (h)	34,73 ± 10,96	10,18 ± 4,77	0,0040 ***
C_{max} (µg/ml)	0,22 ± 0,08	0,21 ± 0,19	0,2583
T_{max} (h)	1,25 ± 0,61	2,08 ± 2,18	0,3792
MRT _{0-tlast} (h)	15,09 ± 3,15	6,87 ± 1,82	0,0022 ***

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

- *Diferencia significativa
- ** Diferencia altamente significativa
- *** Diferencia muy altamente significativa

Tabla 48. Valores obtenidos de P , luego del análisis estadístico de AUC, $T_{1/2}$, y MRT en leche de animales sanos y con mastitis. Donde se aplicó el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

Parámetro	Sanos	Mastitis	Valor de "p"
AUC _{0-tlas} (h. µg/ml)	760 ± 196	747 ± 223	0,4259
$t_{1/2}$ (h)	107,6 ± 27,72	99,09 ± 28,46	0,2689
MRT _{0-tlast} (h)	44,42 ± 4,44	47,03 ± 10,41	0,3122

Todos los símbolos fueron explicados al pie de la Tabla 7

VI.5. ESTUDIO DE PENETRACIÓN DE AZITROMICINA EN TEJIDOS

El estudio de penetración tisular fue realizado como un estudio anexo a los objetivos principales de esta tesis y es solo de carácter descriptivo. No se realizó ningún análisis de depleción o disposición tisular ya que para hacer ese tipo de estudios se hubiera requerido un esquema de muestreo más amplio y que incluyera una mayor cantidad de tiempos de muestreo o un esquema de muestreo específico para cada tejido. Esto hubiese requerido el sacrificio de una mayor cantidad de animales, los cuales estaban fuera de nuestro alcance y de los objetivos centrales de esta tesis.

La cantidad de animales disponible para este ensayo fue 12, de los cuales uno fue utilizado como blanco para la preparación de patrones; con los 11 animales restantes se diagramó un muestreo en base a resultados preliminares en suero, obtenidos del ensayo intramuscular en vacas, y de datos bibliográficos reportados por otros autores en humanos (32-85-87-91-93). Los tiempos de muestreo fueron 12, 24, 48, 72, 120, 240 y 600 horas; sacrificando un animal en los tiempos más próximos y distantes del ensayo (12, 240 y 600 horas) y de a 2 animales en los tiempos centrales del ensayo (24, 48, 72 y 120 horas).

Todos los animales fueron inyectados en el mismo momento y en la región de los músculos isquiotibiales derechos, luego de realizada la inyección se tomaron muestras de sangre para la determinación de azitromicina en suero, con el mismo esquema utilizado para el estudio intramuscular en vacas hasta las 276 horas (tabla 52) y luego una muestra final del animal sacrificado a las 600 horas.

Los animales fueron sacrificados por noqueo y exanguinación yugular, de cada tejido se tomó una muestra de 50 gramos, de la siguiente manera:

Músculo: longissimus dorsi y serrato cervical

Hígado: abarcando al menos dos lóbulos y retirando la capsula de Glisson

Riñón: corte longitudinal de ambos riñones

Grasa: perirenal y omental

Pulmón: lóbulos dorsales y ventrales de uno de los pulmones

Cerebro: corte longitudinal de uno de los hemisferios

Testículo: ambos testículos completos

Con estas muestras se realizó una trituración y de este triturado se trabajó con alícuotas de 5 gramos para la extracción.

La preparación de la muestra para la extracción y determinación de azitromicina en cada tejido fue realizada de la siguiente manera:

Se colocaban 5 gramos de tejido en un vaso de precipitado al cual se le agregaban 10 mL de metanol e inmediatamente se homogeneizaba con ultraturax durante 3 minutos. Luego el homogenato era volcado a un tubo, para ser centrifugado durante 30 minutos a 1500 g. Del sobrenadante se trasvasaban 2 mL a otro tubo para evaporar a baño de María a 45°C bajo flujo de nitrógeno; una vez que el tubo estaba completamente seco se conservaba tapado hasta el momento de la siembra.

Para la siembra de la muestra se agregaban 500 microlitros de buffer fosfato pH 8, se agitaba con vortex y luego se sembraban 200 microlitros por duplicado.

Para la preparación de patrones se tomaban 5 gramos de tejido libre de antimicrobiano, se lo trituraba y se lo fortificaba con azitromicina para obtener 0,5; 1; 1,5 y 2 microgramos por gramo. Se dejaba en incubación a 35°C durante 30 minutos para permitir que la molécula se distribuyera en el tejido para posteriormente proceder de la misma manera que para la muestras problema.

Las concentraciones individuales de azitromicina en cada tejido se expresan en la tabla 49 y en la tabla 50 se expresan las concentraciones promedio en cada tejido.

En la tabla 51 se observan las concentraciones máximas alcanzadas en cada tejido, la concentración promedio en suero para el mismo tiempo y la relación entre las concentraciones encontradas en cada tejido y en suero.

En la figura 9 se expresan en forma comparativa por medio de barras las concentraciones halladas en cada tejido.

Tabla 49: Concentraciones individuales en diferentes tejidos luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg en terneros.

Animal (ID)	Tiempo (h)	Músculo	Hígado	Riñón	Grasa	Pulmón	Cerebro	Testículo
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
Nevado	12	2,014	2,434	6,197	0,200	13,966	0,138	4,257
141	24	1,981	3,568	41,656	0,503	27,232	0,628	6,999
Amarillo		3,851	2,925	18,151	0,584	30,845	0,593	6,386
135	48	1,429	3,973	14,789	0,416	22,810	0,140	6,889
139		5,051	3,516	27,527	3,997	20,271	0,224	9,418
131	72	2,018	2,280	7,314	3,066	38,309	0,379	9,745
138		1,010	3,356	10,187	1,741	25,175	0,138	6,640
145	120	1,766	2,628	7,622	0,153	18,191	0,155	8,106
150		0,699	2,750	8,632	0,711	15,915	0,148	8,999
1	240	1,026	4,083	5,646	0,340	18,620	0,192	32,000
2	600	1,400	0,091	0,487	0,290	1,460	0,410	21,990

Tabla 50: Concentraciones promedio en diferentes tejidos luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg en terneros.

Tejido	Músculo	Hígado	Riñón	Grasa	Pulmón	Cerebro	Testículo
Tiempo (h)	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
12	2,014	2,434	6,197	0,200	13,966	0,138	4,257
24	2,915	3,250	29,900	0,500	29,085	0,611	6,695
48	3,240	3,740	21,160	2,210	21,540	0,183	8,155
72	1,515	2,820	8,750	2,400	31,730	0,260	8,192
120	1,228	2,690	8,130	0,433	17,550	0,152	8,552
240	1,026	4,083	5,646	0,340	18,620	0,192	32,000
600	1,400	0,091	0,487	0,290	1,460	0,410	21,990

Tabla 51: Relación plasma–tejido al momento de la máxima concentración en tejido, luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg en terneros.

Tejido	C _{max} µg/g	T _{max} hs	Concentración en plasma al momento de C _{max} µg/mL	Relación tejido-plasma
Músculo	3,24	48	0,155	20,90
Hígado	4,08	240	0,056	72,86
Riñón	29,90	24	0,253	118,18
Grasa	2,4	72	0,121	19,83
Pulmón	31,73	72	0,121	262,23
Cerebro	0,61	24	0,253	2,41
Testículo	32	240	0,056	571,43

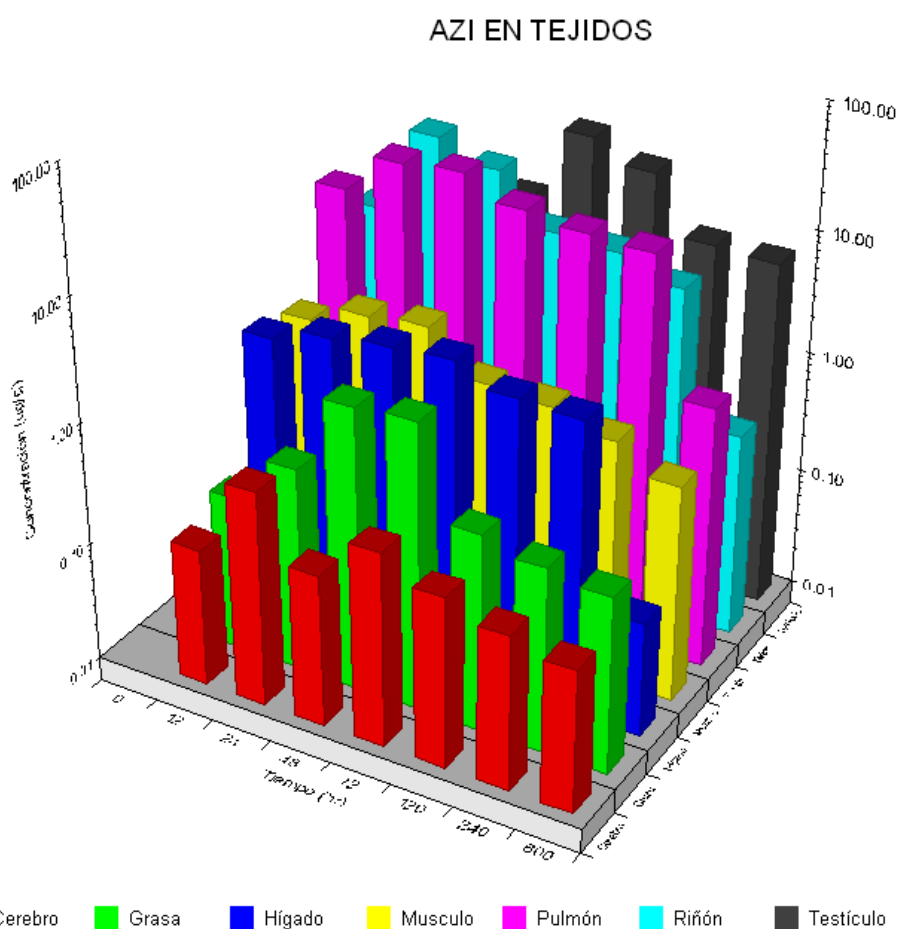


Figura 9. Concentraciones promedio en diferentes tejidos luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 10 mg/kg en terneros.

Tabla 52: Concentraciones séricas individuales y promedios \pm desvíos estándar de azitromicina luego de la administración Intramuscular de 10 mg/kg en terneros utilizados para la evaluación de penetración tisular.

Animal (ID)	Nevado	Amarillo	141	139	135	138	131	145	150	1	2	Promedio	DE
Peso	54	70	72,5	105	3,58	101	99	113	135	160	145	96,189	44,67
Tiempo (h)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	Ug/ml	Ug/ml	Ug/ml	Ug/ml	Ug/ml
0,5	0,073	0,095	0,282	0,141	0,051	0,061	0,214	0,094	0,302	0,665	0,216	0,199	0,178
1	0,140	0,267	0,267	0,171	0,052	0,117	0,214	0,120	0,381	0,587	0,189	0,228	0,149
2	0,413	0,290	0,250	0,198	0,086	0,159	0,249	0,153	0,453	0,553	0,191	0,272	0,144
3	0,268	0,424	0,306	0,253	0,105	0,208	0,346	0,183	0,359	0,388	0,342	0,289	0,096
4	0,224	0,513	0,215	0,308	0,141	0,216	0,321	0,201	0,416	0,553	0,270	0,307	0,134
6	0,371	0,360	0,310	0,335	0,127	0,345	0,307	0,288	0,453	0,799	0,444	0,376	0,165
8	0,278	0,315	0,341	0,394	0,141	0,232	0,280	0,325	0,344	0,426	0,364	0,313	0,079
10	0,216	0,282	0,246	0,428	0,136	0,236	0,316	0,259	0,302	0,371	0,330	0,284	0,079
12	0,193	0,282	0,168	0,442	0,192	0,208	0,264	0,195	0,285	0,339	0,306	0,261	0,082
24		0,267	0,155	0,205	0,181	0,216	0,168	0,165	0,201	0,650	0,321	0,253	0,149
36				0,195	0,171	0,156	0,136	0,220	0,220	0,231	0,291	0,203	0,049
48				0,180	0,127	0,105	0,136	0,170	0,180	0,139	0,206	0,155	0,034
60						0,081	0,086	0,113	0,146	0,135	0,157	0,120	0,032
72						0,074	0,068	0,106	0,201	0,127	0,149	0,121	0,050
84								0,106	0,130	0,109	0,135	0,120	0,015
96								0,092	0,095	0,105	0,135	0,107	0,020
108								0,074	0,073	0,111	0,159	0,104	0,041
120								0,066	0,075	0,093	0,159	0,098	0,042
132										0,100	0,151	0,126	0,036
144										0,081	0,151	0,116	0,049
156										0,069	0,099	0,084	0,021
168										0,087	0,107	0,097	0,014
180										0,077	0,110	0,094	0,023
192										0,058	0,080	0,069	0,016
204										0,062	0,074	0,068	0,008
216										0,055	0,078	0,067	0,016
228										0,053	0,059	0,056	0,004
240										0,053	0,059	0,056	0,004
252											0,063	0,063	NC
264											0,063	0,063	NC
276											ND	ND	NC
600											ND	ND	NC

VII. DISCUSSION

VII.1. FUNDAMENTO DE LA ELECCIÓN DEL MODELO DE ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Supuestos básicos del análisis compartimental

Una vez ingresadas a la circulación sistémica, las moléculas de medicamento presentan cierto grado de difusión desde el compartimiento central hacia determinados tejidos y órganos.

Los antibióticos aminoglucósidos representan un ejemplo interesante de comportamiento farmacocinético, y casi totalmente opuesto a los macrólidos porque debido a sus características físico-químicas (bases fuertes) estos se encontrarían en plasma solamente en su forma ionizada lo que en teoría determinaría su pobre difusión a través de las membranas biológicas. Estas drogas deberían comportarse siguiendo un modelo monocompartimental, dada su escasa distribución. No obstante, tras su administración intravascular, estas presentan una disposición plasmática que puede ser descrita por un modelo de ajuste biexponencial, el que es asociado con la existencia de un proceso de distribución y un proceso de eliminación.

¿Que ocurre para que drogas tan hidrosolubles tengan un proceso de distribución marcado?

Esto es explicado entre otras cosas porque los aminoglucósidos exhiben una afinidad selectiva por el tejido renal. En concordancia con lo mencionado anteriormente, la mayoría de los fármacos que son administrados por la vía intravascular presentan la existencia de al menos dos compartimentos: central y periférico.

En el caso de la molécula que nos ocupa, la azitromicina, en forma casi opuesta, es una sustancia muy liposoluble. Esta droga, gracias a su liposolubilidad se absorbe en forma completa y sigue un proceso de distribución importante con lenta eliminación.

Problemas asociados al diseño experimental

El número de términos exponenciales, que se asocia con el número de compartimentos necesarios para describir la disposición plasmática de una molécula tras su administración intravascular es algo que no puede ser definido con exactitud, dado que exhibe una elevada dependencia de la frecuencia y tiempos de muestreo plasmático, más allá de todos los rasgos atribuibles a la molécula en estudio.

Frecuentemente, perfiles de concentración plasmática derivados de ensayos en donde se han tomado muchas muestras de plasma durante un tiempo prolongado pueden ser ajustados con más términos exponenciales (compartimentos) que los necesarios

cuando la frecuencia y el tiempo de muestreo es menor, por lo que la selección del modelo compartimental está condicionado en gran parte por el diseño experimental y en consecuencia, la estimación de la semivida terminal depende del modelo seleccionado, ya que a medida que el número de compartimientos aumenta, ésta tiende a ser más prolongada (92). Tanto el muestreo muy temprano, como el muestreo tardío (siendo el aumento de sensibilidad de las técnicas analíticas directamente responsable de esto último), pueden repercutir en la discriminación de más compartimientos farmacocinéticos. Esto puede, sin embargo, ser corregido, a través de métodos de discriminación de modelos del tipo del Test Maice (106).

Problemas asociados a la variabilidad de los procesos farmacocinéticos

Otro inconveniente está asociado a la variabilidad de los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, que determinan diferencias entre los perfiles plasmáticos de diferentes individuos. De esta manera puede resultar que luego de administrar una misma dosis de un fármaco a varios individuos, los perfiles plasmáticos de algunos puedan ser ajustados con un modelo de dos compartimientos y los del resto de los individuos deban ser ajustados con un modelo de tres compartimientos.

El problema que se plantea entonces es si los datos de todos los sujetos deben ser obligados a “un modelo único”, o si se debe respetar para cada uno el modelo basado en el ajuste de su nivel individual de plasma de datos concentración-tiempo (siendo un gran inconveniente el de utilizar modelos diferentes para diferentes individuos, que las pendientes de las últimas fases de eliminación sean demasiado distintas y por lo tanto también los sean las semividas de eliminación). Estas y otras preguntas plantean verdaderos problemas en el uso del análisis compartimental, problemas que pueden, en razonable medida, evitarse con un análisis no compartimental.

Problemas de interpretación asociados al análisis compartimental

Cuando un fármaco es administrado por la vía extravascular, a menudo no es posible distinguir la fase de distribución mediante inspección visual del perfil de concentración plasmática. Como consecuencia de lo anterior, el perfil plasmático extravascular puede ser descrito con un modelo biexponencial para describir la fase de absorción y eliminación aparentes.

Este fenómeno que se denomina desvanecimiento del término exponencial asociado a la fase de distribución (73, 74), se debe a que la velocidad del proceso de distribución es mayor que la velocidad de absorción del medicamento.

El modelo biexponencial entonces puede ser erróneamente interpretado como que el organismo tras una administración extravascular, se comporta como un único compartimiento en donde el fármaco se encuentra distribuido en forma uniforme y homogénea, cuando en realidad el proceso de distribución está siendo operativo pero se encuentra solapado por el de absorción.

Debe tenerse en cuenta que la discriminación del mínimo número de compartimientos necesario para explicar el comportamiento farmacocinético de una molécula solo debería realizarse a partir del análisis de un perfil plasmático obtenido tras una administración IV, si el objetivo es una descripción farmacocinética minuciosa.

En vista de lo expuesto, el análisis farmacocinético basado en el ajuste de los datos experimentales con modelos compartimentales, a menudo genera dificultades y problemas difíciles de resolver, por lo que muchos investigadores adoptan como procedimiento el análisis de los datos experimentales del modo no compartimental (75).

Ventajas del análisis no compartimental

El término “análisis no compartimental”, puede dar lugar a confusiones, ya que en realidad, cuando se determinan concentraciones plasmáticas, se asume que la dosis del fármaco administrado se halla “disuelta” en un volumen aparente, lo que da origen a las concentraciones plasmáticas, asumiendo entonces que al menos un compartimiento está siendo operativo. Convendría entonces ser más objetivo en la definición y hablar de análisis modelo-independiente.

Si bien para el análisis farmacocinético modelo independiente, se necesita asumir que la farmacocinética de la droga es lineal dentro del margen de concentraciones plasmáticas observadas, este tipo de análisis presenta ciertas ventajas como son:

- Se trabaja con los datos experimentales observados y no con los valores estimados.
- El análisis no compartimental es menos propenso a la manipulación de datos.
- El cálculo de los parámetros farmacocinéticos se realiza con un mínimo de intervención por el investigador.
- Parámetros como C_{max} y T_{max} se obtienen por observación directa de los datos experimentales.

Dos pasos son fundamentales en el análisis modelo independiente:

- El cálculo de las AUC desde tiempo 0 hasta el último punto con la concentración cuantificable
- El cálculo de la constante aparente de eliminación terminal.

Un ejemplo de la confiabilidad de los resultados obtenidos con el análisis modelo independiente es que el mismo es aconsejado como primera elección para la realización de los estudios de bioequivalencia por las agencias de medicamentos reconocidas como EMEA y FDA (76, 77, 78, 92).

VII.2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

La administración de AZI en bovinos por cualquiera de las vías evaluadas en esta tesis –intra y extravascular- demostraron que la droga se distribuye rápidamente desde sangre hacia glándula mamaria, siendo sus concentraciones en suero muy bajas respecto de las concentraciones alcanzadas en leche. Este comportamiento se observó tanto en animales sanos como en animales con mastitis. Si bien las concentraciones en sangre tienden a ser muy bajas respecto de las encontradas en leche, estas se mantienen durante largos períodos.

El hecho de que las concentraciones de AZI en leche sean mucho más altas que las encontradas en plasma se debe a su gran lipofilia, lo que repercute en un gran volumen de distribución.

Los parámetros farmacocinéticos muestran una alta permanencia en el compartimiento periférico, siendo el $T_{1/2}$ en leche de 3 a 4 veces mayor respecto del plasmático.

Estos datos coinciden con los reportados por otros investigadores sobre trabajos realizados en el hombre y otras especies animales como caballo, cabra y perros; así como también datos reportados en trabajos realizados con otros macrólidos como eritromicina.

VII.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE AZITROMICINA LUEGO DE SU ADMINISTRACIÓN ENDOVENOSA EN VACAS LECHERAS HOLANDO ARGENTINO EN LACTACIÓN, SANAS Y CON MASTITIS SUBCLÍNICA

Azitromicina es un macrólido extensamente utilizado en medicina humana desde hace varios años. Su comportamiento farmacocinético ha sido bien estudiado en el hombre (80, 87) y diferentes especies animales como por ejemplo en ratas (97), gatos (81), potrillos (98, 79), perros (31), conejos (52), ovejas (86) y cabras (78). Sin embargo son escasos los estudios realizados para azitromicina en bovinos (84), aunque sí se ha evaluado el comportamiento cinético de diferentes macrólidos como tilosina (99), eritromicina (100), tilmicosina (101) o tulatromicina (102), ésta última con características muy similares a la azitromicina.

En cuanto a la azitromicina, en general todos los estudios cinéticos realizados han sido tras su administración oral o intravenosa. En el hombre, la principal vía de biotransformación involucra una N-demetilación de la desosamina ubicada en la posición 9ª del anillo macrólido, y una O-demetilación e hidrólisis y/o hidroxilación de la clánidosa y de la desosamina del anillo. Se han identificado más de 10 metabolitos de azitromicina, todos ellos microbiológicamente inactivos (82, 83). Por esta razón se ha reportado una equivalencia analítica entre la cromatografía y el método microbiológico (71).

Luego de la administración intravenosa de azitromicina, a razón de 10 mg/kg de peso vivo, las concentraciones séricas promedio fueron 2.803 ± 0.372 y $2,877 \pm 0.306$ $\mu\text{g/mL}$ a las 0.083 h post-administración, en animales sanos y con mastitis respectivamente. A partir de ese momento, las concentraciones de azitromicina descendieron abruptamente durante las primeras 12 horas, para luego evidenciar un descenso muy lento hasta alcanzar niveles en el orden de los 0.118 ± 0.082 y 0.245 ± 0.063 $\mu\text{g/mL}$ a las 120 h post-administración, en ambos grupos experimentales respectivamente. Los niveles obtenidos coinciden en línea general con aquellos informados por otros autores en diferentes especies tras la misma vía de administración (86, 78).

Azitromicina, es un antimicrobiano que se caracteriza por alcanzar altas concentraciones tisulares, las que se mantienen durante períodos de tiempo muy prolongados, aún cuando las concentraciones plasmáticas hubiesen alcanzado niveles muy bajos (88).

Luego del análisis farmacocinético, por método no compartimental, se determinó una semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) muy prolongada, $38,6 \pm 9,11$ y $53,1 \pm 3,36$ horas para animales sanos y con mastitis respectivamente. Este comportamiento concuerda con las

características farmacológicas de la molécula y coincide con las prolongadas semividas reportadas por Cárceles y colaboradores para otras especies (cabra, oveja y conejo) tras la administración de azitromicina por la misma vía, siendo los valores hallados 32,5; 47,7 y 21,8 horas para cabra, oveja y conejo respectivamente (78, 86, 52). La dosis administrada en cabras y ovejas fue 20 mg/kg mientras que en conejos utilizaron una dosis similar a la nuestra (10 mg/kg). En las tres especies mencionadas, el análisis farmacocinético de los datos se realizó siguiendo un modelo compartimental de tres exponentes y un esquema de pesada 1/concentración.

El volumen aparente de distribución al estado estacionario ($V_{d_{ss}}$) fue aproximadamente de 6 L/kg (Tablas 5 y 6) tanto en animales sanos como en animales con mastitis. Este volumen es considerado elevado y se correlaciona con la alta liposolubilidad de la molécula en estudio, lo que sugiere una excelente penetración y distribución de la misma en los fluidos orgánicos, incluyendo sitios subcelulares. Sin embargo fue inferior a los volúmenes de distribución reportados por otros autores en diferentes especies (78, 79, 81, 87, 53). Cárceles y col., (2005) informan en ovinos, un $V_{d_{ss}}$ de 30.14 L/kg, tras la administración de una formulación comercial a base de azitromicina (Pfizer, Inc., New York, USA) a razón de 20 mg/kg, recordemos que nosotros utilizamos una solución formulada en una matriz 100% acuosa y una dosis de 10 mg/kg de peso vivo. También debemos considerar que el animal Holstein que se utilizó en el presente estudio es magro por naturaleza y eso podría explicar un V_d más bajo.

El AUC concentración sérica de azitromicina en función del tiempo, fue de $81,710 \pm 10,4 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ en animales sanos y $118, 0 \pm 3,60 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ en vacas con mastitis. Estos valores de AUC son muy superiores a los reportados por Foulds y cols. (1990) en humanos de $9,6 \pm 4,8$ (87). Y más del doble de lo reportado por Cárceles y cols., (2005) para ovejas donde el AUC luego de la administración intravenosa de azitromicina a la dosis de 20 mg/Kg fue de 38,8 (86). Esta mayor disponibilidad plasmática de azitromicina en bovinos, también contribuiría a explicar el menor valor de volumen de distribución calculado en nuestro estudio.

El Clearance corporal fue $114,577 \pm 17,9 \text{ mL}/\text{hr}/\text{kg}$ en vacas sanas y $98,90 \pm 3,92 \text{ mL}/\text{hr}/\text{kg}$ en vacas con mastitis. Estos valores son bajos en comparación con los reportados en humanos ($610 \text{ mL}/\text{hr}/\text{kg}$), aunque esta comparación es poco relevante en términos numéricos ya que el régimen de dosificación en humanos es por infusión y en varios días (4 a 5 días), dando una dosis acumulada de 2.500 a 4.000 mg por individuo, equivalentes a 40 mg/kg aproximadamente. Por otro lado Cárceles y cols., reportan valores de Clearance en el orden de 850 y 520 mL/hr/kg, con semividas de eliminación de 32,5 y 47,7 para cabras y ovejas respectivamente. lo cual indicaría que los pequeños rumiantes depuran AZI más

rápidamente que los bovinos, lo cual podría explicar la ligeramente menor semivida de eliminación reportada por Cárceles y col para ovinos y caprinos. Al comparar estadísticamente los parámetros farmacocinéticos obtenidos en vacas sanas con aquellos obtenidos en vacas con mastitis se encontraron diferencias significativas fundamentalmente en área bajo la curva, clearance y tiempo medio de residencia (Tabla 11). Encontramos diferencias estadísticas altamente significativas en la disponibilidad plasmática entre animales sanos y portadores de mastitis ($81,71 \pm 10,44$ vs. $118,0 \pm 3,60$, $P 0,0009$). Este hallazgo lo podemos explicar aplicando la hipótesis del coeficiente de reparto, en animales normales el pH de la leche es ligeramente más ácido que el de la sangre (6.6 vs. 7.4), de manera que AZI, que es una droga alcalina, sufrirá un mayor secuestro iónico en la glándula mamaria, y por lo tanto su disponibilidad plasmática disminuirá. Por otra parte, en la leche de los animales con mastitis el pH aumenta acercándose al valor sanguíneo, la molécula está menos ionizada y mantiene su facilidad de pasaje a través de la barrera sangre-leche determinando un aumento de su disponibilidad plasmática. Lo explicado se corresponde con el mayor tiempo medio de residencia y menor clearance obtenido en animales enfermos.

El paso de AZI a glándula mamaria fue rápido, ya que las concentraciones en leche comenzaron a detectarse a partir de los 10 minutos post- administración endovenosa y superaron largamente a las obtenidas en sangre. La eliminación por esta vía se realizó en forma muy lenta, manteniendo concentraciones en el orden de $1,5 \mu\text{g/mL}$ a las 120 horas pos-administración, 9 veces más altas que aquellas encontradas en sangre para ese mismo tiempo. Es importante destacar que estas concentraciones superan la CIM de $0,5 \mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus* (principal agente causal de la mastitis bovina subclínica) (84).

Luego del análisis farmacocinético no compartimental la semivida de eliminación en leche ($T_{1/2\lambda}$) fue $113,3 \pm 39,5$ y $111,2 \pm 21,1$ horas para animales sanos y con mastitis respectivamente, siendo en ambas situaciones más altas que aquellas obtenidas en plasma. Se alcanzó una C_{max} de $3,82 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ a las 9 horas (T_{max}) en vacas sanas, mientras que en los animales con mastitis el pico fue ligeramente inferior ($3,13 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$), pero se presentó un poco más tarde (T_{max} 12 horas). Azitromicina pasa rápidamente hacia la glándula mamaria y es secretada extensamente por leche. Si bien no existen datos acerca del perfil de eliminación por leche en otras especies animales, sí se cuenta con algunos datos de distribución tisular en el hombre donde se comprueba la buena llegada a diversos órganos como pulmón, glándula salival, útero, ovario; o a diferentes fluidos como secreción bronquial, saliva, humor acuoso, etc. (32, 88, 89, 90, 91, 92).

El AUC concentración en leche en función del tiempo fue $312,3 \pm 15,5 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ para animales sanos y $273,0 \pm 56,6 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ para las vacas con mastitis, dando lugar a una biodisponibilidad láctea (F_L) de $389,4 \pm 69,35 \%$ en animales sanos y $232,25 \pm 52,71 \%$ en animales con mastitis. Es decir que, en leche encontramos entre 200 y 300 veces más AZI que en suero.

Además de concentrarse ampliamente en la glándula, su semivida de eliminación desde la misma -como mencionamos- es muy lenta, lo cual se corrobora con el prolongado TMR obtenido, $53,5 \pm 3,48$ y $53,6 \pm 1,69$ en ambos grupos experimentales (sanos y enfermos respectivamente).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los parámetros cinéticos obtenidos del análisis de los datos en leche entre ambos grupos. No ocurrió lo mismo con la biodisponibilidad en leche, en donde sí hallamos diferencias significativas entre animales sanos y con mastitis, tal lo explicamos al describir la estadística en suero (Tabla 12).

Azitromicina demuestra a través de este estudio el comportamiento típico de los macrólidos estudiados en medicina humana y veterinaria, con concentraciones bajas en sangre, volumen de distribución elevado y semivida de eliminación prolongada. Y muchas similitudes respecto de los resultados obtenidos con azitromicina en humanos; donde las concentraciones en sangre bajan rápidamente y el pasaje de droga hacia los tejidos -como la glándula mamaria- se hace rápidamente. La molécula permanece por largos períodos en tejidos blandos como glándula mamaria y desde aquí se elimina lentamente (clearance bajo, semivida larga y un gran AUC).

Estas características farmacocinéticas, representan a priori, una gran ventaja desde el punto de vista terapéutico para el tratamiento de las mastitis infecciosas del bovino, por el gran intervalo de dosis que supone una droga con estas características y su excelente llegada a la glándula mamaria. De hecho, en un trabajo previo publicado por Lucas y col (2009), se alcanzó la cura bacteriológica en 7 de 8 cuartos mamarios infectados y el conteo de células somáticas disminuyó de **2.200.300 a 223.000** luego del tratamiento con azitromicina.

No cabe duda que por su comportamiento farmacocinético se trata de una excelente herramienta para el tratamiento de la mastitis y otras infecciones del bovino aunque también hay que considerar que para vacas en lactación el período de espera podría ser muy prolongado, lo cual limitaría su utilización por razones económicas.

Los antimicrobianos administrados parenteralmente deben llegar a la glándula mamaria a través de la circulación sanguínea. Las concentraciones alcanzadas van a depender de la habilidad de la molécula de penetrar el endotelio capilar y de difundir a

través de las membranas biológicas de naturaleza lipoproteica (13). El grado de ionización del antimicrobiano en leche y en plasma, su liposolubilidad, y el porcentaje de unión a las proteínas de la leche y del plasma determinarán sus concentraciones en leche y en la circulación sistémica (5). En general, solo las moléculas liposolubles no ionizadas y libres alcanzan la glándula mamaria y se eliminan por leche. Azitromicina es una base orgánica altamente liposoluble (pKa: 8,74) con un 7 % (2µg/mL) a 51 % (0,2 µg/mL) de unión a proteínas (dependiendo de la concentración) y un bajo grado de ionización (103). Es decir, es una molécula que se distribuye fácilmente a través del tejido mamario y la leche. Debe tenerse siempre presente que las diferentes formulaciones de un mismo principio activo, influirán en la liberación y eliminación del mismo, por lo tanto cualquier modificación realizada en la fórmula incidirá en el tiempo de permanencia en la glándula (5).

En general los estudios farmacocinéticos en bovinos de leche son realizados en animales normales; el uso de animales con mastitis subclínica o clínica, homogéneamente seleccionados, puede contribuir a un mejor entendimiento de posibles tratamientos y de sus implicancias farmacocinéticas y farmacodinámicas. Probablemente, en los países realmente desarrollados desde el punto de vista lechero, los planes de administración diseñados por las empresas no puedan ser objetados, debido a la homogeneidad del rendimiento de los rodeos. En nuestro país, pese al elevado nivel alcanzado por muchas explotaciones, siguen existiendo explotaciones de escaso rendimiento y pobre perfil sanitario. Hemos detectado importantes diferencias farmacocinéticas y en períodos de retirada entre animales normales y mastíticos. Este es un problema que, si no se estudia debidamente, puede resultar en cuantiosas pérdidas económicas (5, 8, 9, 99).

VII.4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE AZITROMICINA LUEGO DE SU ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR EN VACAS LECHERAS HA EN LACTACIÓN, SANAS Y CON MASTITIS SUBCLÍNICA

Como mencionamos en el apartado anterior, casi todos los estudios realizados con azitromicina en diferentes especies han sido efectuados luego de su administración intravenosa u oral, con la excepción de nuestro trabajo y otros estudios realizados por Cárceles y col. en ovinos, caprinos y conejos (86, 78, 52). La administración oral de AZI, frecuentemente está asociada a varios efectos adversos a nivel del tracto gastrointestinal (vómitos, dolor abdominal, diarreas) (28). La incidencia o severidad de estos podría verse incrementada en especies herbívoras donde muchos de los efectos tóxicos de los antimicrobianos son ocasionados al interferir con los efectos protectores de la microflora normal o por alterar la función metabólica de la flora microbiana del tracto digestivo (72). Los agentes antimicrobianos macrólidos, en general, no son utilizados en el hombre por la vía intramuscular, pero en medicina veterinaria existen diferentes formulaciones para su administración intramuscular profunda (104, 105, 84).

Luego de la administración intramuscular en dosis única a razón de 10 mg/kg, las concentraciones de azitromicina en sangre fueron detectadas desde la primera muestra obtenida a los 30 minutos post inyección y se mantuvieron en niveles mensurables durante las 120 horas que duró el ensayo (Fig. 3). Las concentraciones se incrementaron hasta las 2 horas, momento en el cual se produjo la C_{max} , para luego disminuir muy lentamente. En leche AZI se comenzó a cuantificar entre la primer y segunda hora tras su administración, alcanzando la C_{max} alrededor de las 10 horas, para luego decrecer en forma muy lenta –al igual que en suero–, pero con concentraciones mucho más elevadas (Fig. 4). La relación $C_{max \text{ -leche}} / C_{max \text{ -suero}}$ fue de 4,73 para animales sanos y 5,24 para animales con mastitis (Tabla 22).

Tanto en plasma como en leche AZI demostró una prolongada persistencia con una lenta pendiente de eliminación. En la curva de disponibilidad sérica se identifican claramente las fases de absorción, distribución y eliminación (Fig. 3); mientras que en leche no se evidencia la distribución pero si una extensa fase de eliminación.

Si bien, como mencionamos, no existen muchos estudios realizados por la vía intramuscular, estos hallazgos coinciden en líneas generales con lo descrito por otros autores luego de la administración oral, donde azitromicina se caracteriza por alcanzar altas concentraciones tisulares y en fluidos, las cuales se mantienen durante períodos de tiempo prolongados, aún cuando las concentraciones plasmáticas hubiesen alcanzado niveles muy bajos (88).

La Cmax sérica fue $0,92 \pm 0,11$ $\mu\text{g/ml}$ en vacas sanas y $0,66 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ en vacas con mastitis. Estos valores son superiores a los descritos por Lucas et al. $0,18 \pm 0,03$ y $0,11$ $\mu\text{g/ml}$ luego de aplicar dos dosis intramusculares de 10 mg/kg con un intervalo de 48 horas (84). Sin embargo son coincidentes con Cárceles y cols., quienes reportan valores de 0,64 y 1,26 para cabra y oveja, luego de la administración intramuscular de 20 mg/kg en una sola dosis (78, 86).

El pico de concentración se produjo a las $3 \pm 1,55$ horas (Tmax) en vacas sanas y a las $2,17 \pm 0,41$ horas en las vacas con mastitis. Lucas y cols., reportan $2,08 \pm 1,56$ horas luego de la primera dosis también en animales con mastitis. Es posible que en el trabajo de Lucas, al no realizar el mismo protocolo de muestreo, no se haya visualizado el momento exacto en donde ocurrió el pico de concentración. Cárceles y cols., reportaron un Tmax más temprano que nosotros (1,24 y 1,25 horas post-administración en ovejas y cabras, respectivamente).

La semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) fue $39,11 \pm 7,64$ y $47,31 \pm 9,75$ horas en animales sanos y con mastitis respectivamente. Estos valores coinciden con la $T_{1/2\lambda}$ hallada por Lucas y cols., ($32,66 \pm 21,63$) (85) y con las prolongadas semividas reportadas por Cárceles y col. en cabras y ovejas tras la administración intramuscular de AZI a razón de 20 mg/kg (45,2 y 61,2 h, respectivamente) (78, 86). Sin embargo nuestra semivida de eliminación fue cerca del doble a la obtenida en conejos tras administrar igual dosis que nosotros (23,1 horas) (53).

El AUC concentración sérica en función del tiempo fue $33,07 \pm 9,14$ $\mu\text{g*hr/mL}$ en animales sanos, mientras que en vacas con mastitis obtuvimos un AUC de $22,18 \pm 2,40$ $\mu\text{g*hr/mL}$. Nuevamente, como informamos en el ensayo intravenoso, nuestros valores de AUC fueron muy superiores a los reportados por otros autores. Foulds y cols., reportan un AUC de $9,6 \pm 4,8$ en humanos (87) y en el estudio realizado previamente en vacas lecheras por Lucas y cols., se estimó un AUC aún menor ($3,39 \pm 1,23$) (84). Sin embargo coincidimos con Cárceles y cols., quienes estimaron un AUC en ovejas, luego de la administración intramuscular de azitromicina a la dosis de 20 mg/Kg, de 36 $\mu\text{g*hr/mL}$ (86).

En bovinos hallamos que AZI según nuestra formulación experimental, tras su administración intramuscular presenta una menor biodisponibilidad sérica ($41,38\% \pm 13,98$ en animales sanos y $22,41\% \pm 2,11$ en animales con mastitis) cuando la comparamos con los datos reportados por Cárceles y col. tras sus estudios en ovinos y caprinos (78, 86).

El tiempo medio de residencia desde el tiempo cero hasta la última muestra ($MRT_{0-t_{\text{last}}}$), fue $40,07 \pm 1,43$ y $40,40 \pm 2,2$ horas en vacas sanas y con mastitis respectivamente. Esta prolongada permanencia se condice con las prolongadas semividas de eliminación obtenidas, reflejando la persistencia de la molécula en el organismo. Sin embargo nosotros

obtuvimos un MRT menor que el reportado por Cárceles y col. en ovejas ($58,34 \pm 8,05$ h) y en cabras ($60,31 \pm 9,28$ h) (78, 86). Esta diferencia podría deberse a la mayor dosificación utilizada por Cárceles y a diferencias anátomo-fisiológicas propias de cada especie. Nuestros animales experimentales fueron bovinos Holstein, animales magros por naturaleza, mientras que los ovinos y caprinos, y fundamentalmente las razas españolas, se caracterizan por ser animales con un alto contenido de tejido adiposo.

Al comparar estadísticamente los parámetros farmacocinéticos obtenidos en vacas sanas y vacas con mastitis se encontraron diferencias altamente significativas en C_{max} , área bajo la curva y por consiguiente en la biodisponibilidad intramuscular (Tabla 23).

Tras ésta vía de administración, el paso de AZI a leche fue más lento que tras su administración endovenosa. A los 30 minutos post-administración no se detectó AZI en ningún animal; a la hora se cuantificó AZI en un solo animal perteneciente al grupo con mastitis; a las dos horas se detectó en 7 de los 12 animales; a las 3 horas en 9 animales y recién a las cuatro horas postadministración todos los animales de ambos grupos presentaban concentraciones mensurables de AZI en leche (Tablas 15 y 16). La C_{max} en leche fue muy superior a aquella obtenida en suero, arrojando una $R C_{maxL}/C_{maxS}$ de $4,85 \pm 2,67$ y $5,26 \pm 0,73$ para vacas sanas y con mastitis respectivamente. Nuevamente la eliminación de AZI por leche se realizó en forma muy lenta, manteniendo concentraciones entre 1,5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 120 horas pos-administración y superando así ampliamente -32 veces más altas- a las obtenidas en sangre para ese mismo tiempo. Se mantuvieron concentraciones cuatro veces por arriba de la CIM para *Staphylococcus aureus* (84).

Como mencionamos la penetración en leche fue más lenta, dando lugar a un T_{max} más tardío que para la administración endovenosa, $17,33 \pm 10,56$ horas en vacas sanas y $13,7 \pm 5,13$ horas en vacas con mastitis, coincidiendo con el T_{max} obtenido por Lucas y cols. (84). La semivida de eliminación en leche ($T_{1/2\lambda}$) fue 105 ± 40 y 135 ± 39 horas, ambos mucho más prolongados que los obtenidos en plasma.

En el trabajo realizado por Lucas y cols., luego de la administración de 2 dosis de azitromicina a razón de 10 mg/kg y con un intervalo de 48 h, la $C_{m\acute{a}x1}$ alcanzada en leche fue 7,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en plasma fue 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la $C_{m\acute{a}x2}$ en leche fue 7,82 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que a nivel plasmático fue 0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acuerdo a estos valores, los niveles lácteos de azitromicina fueron 40 a 70 veces superiores a los niveles alcanzados en plasma (84). Estas diferencias en la C_{max} reportada por Lucas respecto de este trabajo, pueden deberse a diferencias en los niveles de producción de los animales utilizados y al tipo de formulación utilizada; más aún si consideramos que el T_{max} en leche reportado por Lucas fue $15,33 \pm 10,33$ luego de la primer aplicación, valor muy similar a los $17,33 \pm 10,56$ horas en vacas

sanas y $13,7 \pm 5,13$ horas en vacas con mastitis encontradas en este estudio. Otro aspecto fundamental es que todos los animales utilizados en el estudio de Lucas, eran enfermos, con alto conteo de células somáticas y con aislamiento positivo a *Staphylococcus aureus* en alguno de los 4 cuartos mamarios.

Cuando Lucas y cols., compararon la C_{max} en leche de cuartos mamarios sanos versus cuartos mamarios con mastitis no encontraron diferencias significativas ni en $C_{máx1}$ ni en $C_{máx2}$, siendo los valores alcanzados de $C_{máx1}$ para los cuartos mamarios mastíticos $7,8 \mu\text{g/mL}$ y en la leche de los cuartos mamarios sanos $7,74 \mu\text{g/mL}$, mientras que la $C_{máx2}$ fue $8,09 \mu\text{g/mL}$ y $7,68 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Los valores de $T_{1/2\lambda}$ ponen en evidencia que, además de alcanzar altas concentraciones en leche, las mismas tienden a disminuir más lentamente en leche respecto de lo que sucede en plasma. El $T_{1/2\lambda}$ determinado a partir de las concentraciones lácteas fue 4 veces más prolongado que el plasmático. El mismo comportamiento PK fue hallado por Lucas y col., (84).

El AUC fue $310 \pm 80 \mu\text{g*hr/mL}$ en animales sanos y $310 \pm 51 \mu\text{g*hr/mL}$ en las vacas con mastitis. A priori podríamos suponer que la molécula se comporta de manera similar tanto en una ubre sana como en una ubre con mastitis. Sin embargo al calcular la F_L (biodisponibilidad láctea) encontramos que luego de la administración intramuscular por alguna razón la molécula se concentró más en el órgano blanco enfermo ($1042,7\% \pm 518,5$ para las vacas sanas y $1422,4\% \pm 350$ para las vacas con mastitis), arrojando una P de 0,0289. En este ensayo, encontramos que el AUC sérica fue inferior en los animales enfermos (recordemos que luego de la administración endovenosa obtuvimos lo contrario), es decir la molécula abandonó en mayor magnitud el lecho vascular, lo que determinó una mayor F_L a favor de los animales enfermos. Una explicación para este interesante hallazgo es el hecho de tratarse de animales diferentes en ambos ensayos, por un lado el grupo experimental utilizado para el estudio intravenoso estaba constituido por animales de mayor producción (entre 15 y 22L/d) que los animales utilizados para el estudio intramuscular (8,5-16 L/d), de manera que AZI se encontraba por un lado más diluida en esas ubres y por otro lado, en cada ordeño se eliminaba mayor cantidad de antimicrobiano que en animales de menor producción. Recordemos que los animales fueron ubicados dentro del grupo enfermo o sano según tuvieran un CCS mayor o menor a 600.000 y tuvieran aislamiento microbiológico positivo o negativo, así el grupo sano utilizado en el ensayo endovenoso presentó un CCS promedio de $492.540,50 \pm 51.721,81$ (rango 410.908 a 543.780) y el grupo enfermo presentó un promedio de $772.179,67 \pm 90.639,72$ (rango 689.763 a 926.543). Mientras que los animales que formaban parte de este ensayo intramuscular presentaban un

CCS de $135.500 \pm 73.074,62$ (rango 29.000 a 219.000) y $1.582.667 \pm 525.444,83$ (rango 932.000 a 2.173.000) para el grupo sano y con mastitis, respectivamente. De estos datos se desprende que los animales enfermos correspondientes a este estudio presentaban 2.5 veces más células que el grupo enfermo del estudio intravenoso. Azitromicina es justamente un antimicrobiano que tiende a concentrarse varias veces en el ambiente intracelular ácido, fundamentalmente en las células fagocíticas (107) donde penetran por difusión simple (108). Los leucocitos, principalmente neutrófilos, macrófagos y monocitos, acumulan AZI en sus lisosomas y la transportan al sitio de la infección (109, 110).

El valor de MRT fue $55,33 \pm 2,91$ mL/hr/kg en vacas sanas y $56,93 \pm 1,5$ mL/hr/kg en vacas con mastitis, corroborando la prolongada permanencia de la molécula en la glándula mamaria.

No se observaron diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos mediante análisis farmacocinético no compartimental para animales sanos y con mastitis (AUC, $T_{1/2\lambda}$, C_{max} , T_{max} y MRT), (Tabla 24), excepto, como hemos explicado anteriormente, para la biodisponibilidad láctea (F_L) que fue superior en los animales enfermos.

Azitromicina, luego de su administración intramuscular, corrobora los hallazgos farmacocinéticos obtenidos tras su administración intravenosa con algunas diferencias sustanciales y dependientes de características fisiopatológicas de los animales, como producción de leche y cantidad de células somáticas. Estas últimas, dos importantes variables que deben ser consideradas a la hora de diseñar regímenes posológicos racionales con el objetivo de maximizar eficacia y disminuir la presencia de residuos antibióticos por arriba de los límites máximos de residuos permitidos.

VII.5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE AZITROMICINA LUEGO DE SUS ADMINISTRACIÓN INTRAMAMARIA EN VACAS LECHERAS HA EN LACTACIÓN, SANAS Y CON MASTITIS SUBCLÍNICA

Desde el punto de vista farmacocinético la glándula mamaria es un compartimiento periférico con una dinámica particular a causa de su fisiología, donde el antibiótico se administra después del ordeño -con glándula vacía- y hasta el ordeño siguiente acontecen diversas situaciones, por un lado se vuelve a producir leche -lo que genera dilución del ATB- y por otro lado hay absorción desde la glándula mamaria hacia sangre; al cabo de 12 horas aproximadamente (en un establecimiento con 2 ordeños por día) sucede otro ordeño, donde nuevamente la glándula se vacía casi por completo para volver a iniciar el ciclo de producción. La administración de antimicrobianos por vía intramamaria es una práctica muy difundida en medicina veterinaria para el tratamiento de mastitis subclínicas. Es considerada una vía de administración directa en la glándula, en donde obviamos el proceso de absorción que sufre la molécula cuando es administrada por una vía parenteral como la intramuscular. De manera tal, que la biodisponibilidad láctea se considera 100%. Las ventajas de la administración por la vía IMM son las altas concentraciones alcanzadas en la leche y la menor pérdida farmacológica debida a los procesos de absorción y transferencia a través de las membranas biológicas (111). Mientras que las desventajas de esta vía pueden ser la despareja distribución de varios compuestos en el interior de la ubre, el riesgo de contaminación por inoculación de bacterias a través del canal del pezón y la posible irritación del tejido mamario por el fármaco o la formulación utilizada (111). Luego de la administración de una infusión IMM, el contacto entre el agente antimicrobiano y el patógeno dentro de la glándula está supeditado a una serie de eventos sucesivos (12): 1- Fase farmacéutica (desintegración del formulado, disolución del fármaco, excreción del fármaco en la leche), 2- Fase farmacocinética (absorción -leche:plasma-, distribución -local y sistémica-, metabolismo, excreción -local y sistémica-) y 3- Fase farmacodinámica,

El tipo de excipiente que contiene el formulado es el que determina la tasa de liberación del fármaco y la fase farmacéutica es la que gobierna la forma inicial de la curva de concentraciones versus tiempo del antimicrobiano en la leche (12).

Las formulaciones IMM utilizadas para el tratamiento de la mastitis durante el período de lactancia contienen excipientes de liberación rápida, pues el objetivo es erradicar la infección del tejido glandular y minimizar el período de descarte de la leche (12).

El inicio de la fase PK presupone la existencia del fármaco disponible en la secreción láctea y depende de la desintegración del formulado y la disolución del fármaco. Estos procesos determinan la disponibilidad farmacológica.

La cantidad de fármaco recuperado en la leche está influenciada por varios factores, entre los cuales se pueden nombrar el tipo de excipiente utilizado en la formulación, la tasa de pasaje leche:plasma, el tamaño de la ubre y la cantidad de leche que en ella está contenida (12).

El pasaje del antimicrobiano presente en leche implica el movimiento del fármaco a través de una membrana biológica ya sea por difusión pasiva o transporte especializado. Los factores que afectan el pasaje de los antimicrobianos desde la leche hacia el plasma son los mismos que afectan la transferencia de los mismos desde la sangre hacia la leche. Estos factores son el pK_a de la molécula, la liposolubilidad de la fracción no ionizada y el porcentaje de unión al tejido mamario (12). Los fármacos liposolubles, como la AZI, atraviesan la membrana a través de la región lipoproteica y el pasaje de los mismos es directamente proporcional al gradiente de concentración y a la liposolubilidad de la molécula. La fracción no ionizada generalmente es más liposoluble que la ionizada y atraviesa la membrana lipídica con mayor facilidad.

La capacidad de atravesar la barrera leche:plasma es expresada como coeficiente de liposolubilidad por porcentaje de fracción no ionizada (112) y la tasa de pasaje real puede ser cuantificada mediante la relación $C_{m\acute{a}x(plasma)} / C_{m\acute{a}x(leche)}$ o mediante la relación $ABC_{(plasma)} / ABC_{(leche)}$ (12).

El fenómeno de absorción leche:plasma trae como consecuencia la presencia del agente antimicrobiano en plasma sanguíneo. En la circulación sistémica, el fármaco seguirá los fenómenos farmacocinéticos que se suceden luego de la absorción (distribución, metabolismo y excreción) (113).

El fenómeno de distribución del antimicrobiano en el interior de la glándula se produce por difusión pasiva de las moléculas a través de los componentes lipofílicos e hidrofílicos de la secreción glandular. Este fenómeno se ve afectado por la unión del fármaco al tejido mamario y/o a los componentes de la leche (12).

El proceso de excreción del antimicrobiano desde la glándula mamaria está gobernado por el tipo de base utilizada, la cantidad de leche producida, las características propias de la molécula, la salud de la glándula mamaria y el número de ordeños realizados (12).

En este contexto la semivida de eliminación en leche estará bajo la influencia de las variables antes mencionadas para la glándula en ordeño (dilución, pasaje a sangre y eliminación con el ordeño), por lo que sería más adecuado renombrarla como semivida de declinación.

Luego de la administración intramamaria a razón de 125 mg por cuarto mamario durante tres ordeños, las concentraciones de AZI en sangre fueron detectadas desde la primera muestra obtenida a los 30 minutos de la aplicación intramamaria y se mantuvieron en niveles cuantificables entre todos los intervalos de aplicación, para caer por debajo del límite de cuantificación, en todos los animales, entre las 24 y 36 horas post-tercera aplicación intramamaria.

La Cmax en suero (luego de la aplicación de la tercera jeringa intramamaria) fue $0,23 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ en vacas sanas y $0,13 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ en vacas con mastitis, niveles más bajos que los logrados tras la administración intramuscular. El perfil de concentraciones séricas obtenido fue polifásico y muy errático. Sin embargo fueron concentraciones similares a las halladas por Lucas y cols., ($0,18 \pm 0,03$ y $0,11 \pm 0,03$ $\mu\text{g/mL}$) luego de dos dosis intramusculares de 10 mg/kg con intervalo de 48 horas (85). El Tmax se produjo a las $22,75 \pm 0,27$ horas en vacas sanas y a las $22,7 \pm 0,25$ horas en las vacas con mastitis, estos valores corresponden a 1 hora luego de la tercera aplicación intramamaria. Se obtuvo una biodisponibilidad sérica extremadamente baja tras la administración de AZI por esta vía ($2,03 \pm 1,50$ y $1,06 \pm 0,43$ % en animales sanos y con mastitis, respectivamente). Queda claro que la molécula queda retenida en la glándula mamaria. El AUC sérica fue $1,59 \pm 1,03$ $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ para animales sanos y $1,24 \pm 0,5$ $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ para las vacas con mastitis. Estos resultados ponen de manifiesto que para este tipo de moléculas, con gran penetración celular, gran distribución tisular, e importante secuestro iónico en compartimentos más ácidos, no siempre el análisis de las concentraciones séricas nos permitirá hallar una excelente correlación con lo acontecido en el compartimento del efecto, es decir con lo que ocurre en el sitio de la infección. Nuestros datos, coinciden en líneas generales con lo hallado tras la administración intracisternal de eritromicina en vacas lecheras (100), es decir bajas concentraciones plasmáticas y baja biodisponibilidad.

La semivida de eliminación sérica ($T_{1/2\lambda}$) fue mucho más corta que la que obtuvimos luego de las administraciones endovenosa e intramuscular ($11,76 \pm 7,31$ y $16,20 \pm 7,20$ horas para animales sanos y con mastitis respectivamente).

El tiempo medio de residencia ($\text{MRT}_{0-\text{last}}$) fue $4,93 \pm 2,77$ y $7,17 \pm 3,5$ h en vacas sanas y con mastitis respectivamente, mucho más breve que la semivida de eliminación.

No hallamos diferencias estadísticas al comparar los parámetros farmacocinéticos séricos entre animales sanos y enfermos (Tabla 35).

Sin embargo, en leche (obviamente por ser la vía de administración IMM de penetración directa en la glándula) las concentraciones halladas se encontraron en otro orden de magnitud. En la leche de los animales sanos determinamos concentraciones cercanas a los 10 µg/mL tras la primera aplicación intramamaria. De alguna manera la molécula se fue acumulando a pesar de absorberse hacia sangre y de excretarse mediante los ordeños, ya que luego de la segunda y tercera dosificación determinamos concentraciones en el orden de los $16,74 \pm 5,66$ y $16,42 \pm 4,15$ µg/mL respectivamente. A partir de aquí las concentraciones comenzaron a caer rápidamente en las primeras 24 horas y luego en forma más suave durante las siguientes 100 horas para finalizar a las 144 horas post-última administración con niveles en el orden de los 0,8 µg/mL (Tabla 27). En la leche de los animales con mastitis nos encontramos con un comportamiento similar pero con concentraciones varias veces superiores. Tras la primer jeringa intramamaria la concentración fue $57,90 \pm 34,82$ µg/mL, luego de la segunda aplicación $74,83 \pm 40,71$ µg/mL y tras la última administración obtuvimos una concentración de $81,74 \pm 45,50$ µg/mL para declinar a las 144 h a niveles en el orden del µg/mL (Tabla 28). Es decir en los animales enfermos la molécula se comporta de manera diametralmente opuesta a los macrólidos convencionales. Si bien la leche de los animales con mastitis es ligeramente más alcalina, la molécula queda retenida en las células fagocíticas. Y justamente como los animales enfermos se caracterizan por presentar un alto CCS (>600.000), al administrar la molécula por la vía intracisternal se facilita el acceso directo al compartimento celular, en donde la AZI además sufre un secuestro iónico a nivel subcelular dado el pH ácido (6,5-5,5). Por esta razón, como se puede comprobar observando la Figura 6, las concentraciones de AZI en leche mastítica superan en más de diez veces a las encontradas en leche normal con un bajo CCS.

Luego del análisis farmacocinético no compartimental la semivida de declinación en leche ($T_{1/2\lambda}$) fue $59,67 \pm 12,48$ y $46,85 \pm 20,87$ horas en vacas sanas y con mastitis, respectivamente. Esto indica que a pesar de sufrir una gran pérdida a través de los sucesivos ordeños, AZI se elimina muy lentamente desde el compartimento blanco. Esto último queda corroborado con los prolongados tiempos medios de residencia obtenidos.

El AUC fue 435 ± 56 µg*hr/mL en animales sanos y 1534 ± 546 µg*hr/mL en vacas con mastitis, arrojando diferencias muy altamente significativas y reafirmando el concepto de atrapamiento en la glándula mamaria enferma (Tabla 36).

Azitromicina demuestra a través de este estudio diversas características que la diferencian de los macrólidos convencionales: bajas concentraciones en sangre y muy altas

en otros compartimentos, fundamentalmente en aquellos sitios donde se encuentra ubicado el proceso infeccioso. Las concentraciones en sangre decrecen rápidamente y el pasaje de la molécula hacia los tejidos periféricos -como la glándula mamaria- se hace rápidamente, donde permanece por largos períodos y de donde se elimina lentamente.

No cabe duda que por lo expuesto, se trata de una excelente herramienta para el tratamiento de la mastitis clínica o subclínica del bovino. Sin embargo debe considerarse, también, que este tipo de moléculas requiere de un prolongado período de descarte de la leche, tornándose en un inconveniente económico.

Por último hay que destacar, que debido a su extensa eliminación, y por tratarse de un antimicrobiano tiempo dependiente y con efecto postantibiótico, quizás no serían necesarias tres aplicaciones sucesivas como se realizó en este ensayo y sea efectivo un esquema de una sola aplicación como ya se ha demostrado en algunos tratamientos de infecciones en humanos (90, 91).

VII.6. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO DE AZITROMICINA LUEGO DE SUS ADMINISTRACIÓN INTRAMAMARIA EN VACAS LECHERAS AL MOMENTO DE SECADO SANAS Y CON MASTITIS SUBCLÍNICA

Algunas de las consideraciones hechas respecto de la vía de administración para el estudio intramamario en lactación son también válidas para este ensayo. La gran diferencia entre ambos es que aquí por ser un estudio al momento del secado no hay más ordeños y por lo tanto no hay eliminación por leche. Por otro lado, la inflamación que genera la suspensión brusca del ordeño con el secado incrementa la cantidad de células somáticas, haciendo que las diferencias que pudiesen existir por esta variable sean menores.

En los tratamientos IMM administrados al momento del secado, el proceso de liberación del principio activo se prolonga temporalmente y tiene mayor influencia sobre la forma inicial de la curva de concentración versus tiempo (12). El excipiente utilizado puede estar compuesto por aceite vegetal o mineral. La ventaja de los excipientes que contienen aceite mineral, como por ejemplo los aceites de parafina o de glicerina, es que demoran la liberación del principio activo y prolongan la permanencia del antimicrobiano en el interior de la glándula (12, 112). En algunos casos los excipientes contienen otros agentes que incrementan la permanencia, como es el monoesterato de aluminio en una base oleosa (12).

Luego de la administración de jeringas IMM, parte del formulado se perderá junto con la leche que se extrae en los primeros ordeños post-tratamiento. Esta pérdida es despreciable en el caso de los tratamientos hechos al secado, pues las vacas son apartadas de la rutina de ordeño. Sin embargo, con la interrupción de la rutina de ordeño se desencadenan cambios fisiológicos en la glándula mamaria que pueden afectar a las fases farmacéutica y farmacocinética.

Luego del tratamiento IMM de secado, la velocidad de eliminación se ve afectada por la dosis, la naturaleza del vehículo, las características propias del fármaco, el nivel de unión del antibacteriano al contenido de la glándula y al tejido glandular (12, 112).

En nuestro caso, tras la administración intramamaria a razón de 250 mg por cuarto mamario al momento del secado, las concentraciones de azitromicina en sangre fueron detectadas desde la primera muestra obtenida a los 30 minutos post-aplicación intracisternal. A partir de la primera hora las concentraciones descendieron rápidamente y entre las 24 - 36 horas dejaron, en todos los animales, de ser cuantificables.

La C_{max} en suero fue $0,22 \pm 0,08$ en vacas sanas y $0,21 \pm 0,19$ en vacas con mastitis; valores muy similares a los obtenidos luego de la administración IMM de azitromicina en animales en lactación. El pico de concentración se produjo rápidamente

(Tmax), 1.25 ± 0.61 y 2.08 ± 2.18 horas post-administración en vacas sanas y con mastitis, respectivamente y de manera similar a lo ocurrido en el ensayo en lactación.

Si comparamos los valores de Cmax y Tmax en suero obtenidos por la vía intramamaria respecto de los valores obtenidos tras la administración por la vía intramuscular, veremos que tras la administración intramamaria se alcanza una menor Cmax pero de manera más temprana. La Cmax más baja seguramente está vinculada a una dosis/kg muy inferior en el estudio intramamario, mientras que el Tmax más adelantado estaría vinculado a una absorción más rápida desde la glándula mamaria respecto de la vía intramuscular.

La semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) fue $34,73 \pm 10,96$ y $10,18 \pm 4,77$ horas para animales sanos y con mastitis respectivamente, de manera similar a lo explicado en el estudio IMM en lactancia, la semivida de eliminación por esta vía de administración es más corta que la obtenida tras la administración intramuscular. Es importante destacar (como se puede observar en las Tablas 37 y 38) la característica polifásica del perfil sérico, este comportamiento dificultó bastante la estimación de la pendiente de la fase de eliminación. El tiempo medio de residencia ($MRT_{0-tlast}$), fue $15,09 \pm 3,15$ en vacas sanas y $6,87 \pm 1,82$ en vacas con mastitis, bastante menor que tras las administraciones parenterales (IM y EV).

El AUC fue $3,53 \pm 1,28$ para animales sanos y $1,35 \pm 0,81$ para las vacas con mastitis; arrojando una *P* de 0,0120. Al igual que en el ensayo durante la lactancia, se obtuvo una baja biodisponibilidad (*F*) $4,36 \pm 1,52$ y $1,14 \pm 0,67$ % en vacas sanas y con mastitis respectivamente. Queda expuesto que en los animales enfermos el pasaje de la molécula desde la glándula a sangre es muy escaso, esto vuelve a corroborar el secuestro que sufre la AZI en el órgano blanco.

Encontramos diferencias muy significativas y altamente significativas en AUC, $T_{1/2\lambda}$ y MRT (Tabla 47) entre animales sanos y con mastitis, al aplicar el test de diferencias de las medias -test de t- con un límite de significancia del 5% y usando datos logotransformados.

En cuanto al comportamiento de AZI en la glándula mamaria tras la aplicación en el momento del secado, se midieron concentraciones en leche de $46,00 \pm 17,13$ y $46,54 \pm 39,99$ µg/mL en ambos grupos experimentales. Como puede observarse en las Tablas 39 y 40, se obtuvieron desvíos bastante grandes, una explicación a esta variación es que al momento del secado no todas las ubres presentan el mismo grado de producción, el mismo tamaño glandular, el mismo rango de células somáticas. De manera que el antimicrobiano se diluirá en diferentes volúmenes de secreción láctea y se distribuirá en diferentes tamaños de cavidades. A partir de aquí las concentraciones caen rápidamente en las primeras 12

horas y luego lo hacen en forma muy lenta durante las siguientes 132 horas para finalizar a las 144 horas desde el inicio del ensayo con concentraciones promedio de 2,40 y 2,14 µg/mL para vacas sanas y con mastitis respectivamente.

Luego del análisis farmacocinético no compartimental la semivida de declinación en leche fue similar tanto para vacas sanas como mastíticas ($T_{1/2\lambda}$, $107,6 \pm 27,72$ y $99,09 \pm 28,46$ horas, respectivamente), pero más prolongadas que durante el período de lactación ($59,67 \pm 12,48$ y $46,85 \pm 20,87$, respectivamente). Esta es una característica buscada para las formulaciones destinadas al tratamiento durante el período de secado.

El AUC fue 760 ± 196 µg*hr/mL en animales sanos y 747 ± 223 µg*hr/mL en las vacas con mastitis. El valor de MRT fue de $44,42 \pm 4,44$ mL/hr/kg en vacas sanas y $47,03 \pm 10,41$ mL/hr/kg en vacas con mastitis.

Es decir no existen diferencias entre animales sanos y con mastitis, lo cual fue corroborado con el análisis estadístico que no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Tabla 48).

Azitromicina, nuevamente, mantiene su comportamiento descrito en los apartados anteriores: concentraciones séricas bajas y polifásicas, y concentraciones en leche más elevadas y sostenidas durante períodos prolongados, superando 4 a 6 veces el MRT y la semivida de eliminación sérica. De manera que insistimos en la posibilidad de considerar a la AZI una excelente herramienta para el tratamiento y la prevención de la mastitis clínica y/o subclínica del bovino.

Por último, podríamos mencionar que de los datos obtenidos, la dosis administrada para el secado podría ser adecuada, sobre todo si consideramos que AZI es un antimicrobiano con efecto postantibiotico prolongado. Por supuesto que todo esto debería ser corroborado con estudios de eficacia a campo y de modelización farmacocinética/farmacodinámica frente a cada microorganismo susceptible.

VII.7. ESTUDIO DE PENETRACIÓN DE AZITROMICINA EN TEJIDOS

El estudio de penetración en tejidos fue realizado sobre 12 terneros sanos Holando Argentino con un rango de peso entre 140 y 180 kilogramos los cuales recibieron una aplicación intramuscular de azitromicina 10 %, a razón de 10 mg/kg. Posteriormente se procedió al sacrificio de los animales a diferentes tiempos postratamiento para la obtención de muestras de los siguientes tejidos: hígado, riñón, músculo, grasa, pulmón, cerebro y testículo.

El objetivo de esta prueba fue evaluar la distribución y penetración de azitromicina en los tejidos mencionados, pero por limitaciones en la disponibilidad de animales para realizar este ensayo, solo se realiza una descripción de las concentraciones encontradas; ya que para hacer un estudio de depleción se necesita una N mayor por punto y un esquema de muestreo más amplio o particular para cada tejido.

Desde el primer punto de muestreo a las 12 horas postratamiento hasta las 600 horas, momento en el cual se sacrificó el último animal, azitromicina fue detectada y medida en todos los tejidos analizados. Esto nos indica que azitromicina se distribuye rápidamente hacia los tejidos para luego experimentar un lento proceso de eliminación.

Al mismo tiempo las concentraciones y el perfil de la curva en plasma, siguió un comportamiento similar al observado en los ensayos previos.

Las concentraciones máximas en los tejidos analizados fueron encontradas entre las 24 y 72 horas, salvo en hígado y testículo donde las máximas concentraciones se encontraron a las 240 horas. Fueron muy altas en pulmón, riñón y testículo y más bajas en hígado, músculo, grasa y cerebro (tablas 49 y 50).

Las mayores concentraciones encontradas fueron de 32; 31, 73 y 29,9 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en testículo, pulmón y riñón respectivamente; y también mantuvieron la mayor relación tejido-plasma (571,41; 262,23 y 118,18 respectivamente) (tabla 51).

Si bien existen varios estudios que presentan concentraciones de AZI en diferentes tejidos humanos (32, 87, 94), todos ellos corresponden a administraciones orales de 500 mg y en dos tomas de 250 mg con intervalo de 12 horas y uno endovenoso (93). Además estos trabajos por razones obvias corresponden a biopsias realizadas al momento de una cirugía, donde se toma de a un tejido por individuo o dos como máximo. Por otro lado el trabajo mas completo realizado por Fould (1990) y colaboradores, agrupa los resultados en concentraciones de 0,2 a 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y de 1 a 9 $\mu\text{g}/\text{gr}$. Sin embargo y al igual que lo hallado por nosotros en terneros, los tejidos con mayor concentración -1 a 9 $\mu\text{g}/\text{gr}$ - fueron pulmón y

testículo, además de próstata, ovarios, trompas de Falopio, útero y tonsilas; y las concentraciones mas bajas -0,2 a 1 µg/gr- fueron halladas en músculo, grasa y hueso (ver anexos, 87).

Cárceles y colaboradores en un estudio de disposición tisular en conejos tras la administración intramuscular de 10 mg/kg, encontraron concentraciones altas en riñón, pulmón, bazo y corazón; mientras que en bilis fueron muy altas y en músculo encontraron concentraciones bastante bajas (52).

Si bien hay diferencias en los diseños y esquemas de tratamiento tanto en el hombre como en conejos, así como en nuestro ensayo, en estos trabajos los resultados encontrados son coincidentes en cuanto a cuales son los tejidos donde azitromicina penetra con mayor o menor magnitud.

Por último, y en virtud de estos resultados podríamos hipotetizar que una sola aplicación intramuscular de azitromicina a razón de 10 mg/kg podría ser adecuada para el tratamiento de las infecciones producidas en tejidos blandos por gérmenes sensibles a la azitromicina. Estos hallazgos dieron lugar al diseño de nuevos estudios in vitro, in vivo y ex vivo a los efectos de lograr profundizar el conocimiento a cerca de la efectividad de la azitromicina en diferentes modelos de infección y diferentes especies animales.

VIII. CONCLUSIONES

VIII.1. COMENTARIOS ACERCA DE LAS HIPÓTESIS PLANTEADAS

A manera de epílogo creemos conveniente presentar algunos comentarios acerca de las hipótesis que se plantearon al comienzo del trabajo de tesis.

En primer lugar se planteó la hipótesis que azitromicina –al igual que la mayoría de los macrólidos- es una droga que posee un gran volumen de distribución con una buena penetración en la glándula mamaria, alcanzando altas concentraciones en leche.

Esta hipótesis se confirma a través de los resultados obtenidos de los estudios intravenoso e intramuscular, donde la llegada de AZI a leche fue muy rápida y en concentraciones que superaron 9 veces a las halladas en sangre para el caso de la administración intravenosa (comparando los niveles en la cola de la curva) y 5 veces superó la Cmax en leche a la sérica en el ensayo intramuscular.

La segunda Hipótesis planteaba que en animales en lactación, la secreción láctea es una vía de eliminación importante para la azitromicina, a pesar de que normalmente se elimina por vía biliar principalmente y en menor grado por orina.

Esta hipótesis también fue confirmada por los ensayos intravenoso e intramuscular a través de las persistentes concentraciones encontradas en leche a lo largo del muestreo cinético realizado.

Nuestra tercera hipótesis planteaba que azitromicina se distribuye ampliamente hacia tejidos y fluidos biológicos.

Al igual que las hipótesis anteriores, esta también fue confirmada tanto para leche y glándula mamaria luego de los ensayos intravenoso e intramuscular; como para otros órganos de la economía animal dadas las altas concentraciones de AZI encontradas en diferentes tejidos y fluidos luego del estudio realizado en terneros.

La cuarta hipótesis, planteaba que las concentraciones de azitromicina en leche son más elevadas en animales sanos que en animales mastíticos en función de los cambios en el pH de la leche.

Esta hipótesis fue refutada, dado que azitromicina es un macrólido de última generación que se caracteriza por presentar una gran facilidad para penetrar al interior celular en donde queda secuestrada justamente al encontrarse frente a un pH ácido. De manera que en los animales mastíticos con alto conteo de células somáticas, las

concentraciones de AZI en leche superaron varias veces a las alcanzadas en animales sanos.

La quinta y última hipótesis planteaba que luego de la administración intramamaria de azitromicina, esta droga atraviesa la barrera sangre leche encontrándose también en suero.

Esta hipótesis fue confirmada con los dos ensayos intramamarios donde las concentraciones en sangre -si bien fueron de corta duración respecto de otras vías- fueron claramente medibles en todos los animales y con un comportamiento farmacocinético claro y similar entre ellos.

VIII.2. CONCLUSIONES FINALES

Azitromicina demostró, a través de los diferentes estudios realizados en este trabajo el comportamiento diferencial con respecto al resto de los macrólidos utilizados en medicina veterinaria. La droga siempre dio lugar a concentraciones bajas en sangre y altas en otros compartimentos. Presentó muchas similitudes respecto de su comportamiento en el hombre y diferentes especies animales evaluadas por otros autores; con concentraciones en sangre que bajan rápidamente y con un pasaje rápido de la molécula hacia otros tejidos -como la glándula mamaria-, en donde permanece por largos períodos de tiempo y sufre una lenta eliminación

La administración de AZI en bovinos por las vías IV e IM demuestra y confirma que AZI se distribuye rápidamente desde sangre hacia glándula mamaria, siendo sus concentraciones en suero muy bajas respecto de las concentraciones alcanzadas en leche, comportamiento que se dió tanto en animales sanos como en animales con mastitis. Al mismo tiempo los trabajos realizados por la vía intramamaria demuestran que, AZI también se absorbe por esta vía, aunque en forma escasa considerando la concentraciones alcanzadas y el tiempo de residencia. El hecho de que las concentraciones de AZI en leche sean mucho más altas que las encontradas en plasma, se debe a su gran lipofilicidad y volumen de distribución.

No cabe duda que por su comportamiento farmacocinético por cualquiera de las vías estudiadas y su gran penetración tisular, AZI sería una excelente herramienta para el tratamiento no solo de la mastitis, sino también de otras infecciones que afectan a tejidos blandos del bovino.

IX.- BIBLIOGRAFIA

1. NEISSEYRE, R. (1980). Lactología Técnica. Editorial Acribia, S.A. Segunda edición en español. Zaragoza, España.
2. LUQUET, F.M. (1991). Leche y Productos Lácteos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
3. CORBELLINI, C. N. (2000a). "Anatomía y Fisiología de la Glándula Mamaria". 2do Curso de actualización Profesional. UNLP; INTA; CREA.
4. DAHME, E.; WEISS, E. (1993). "Anatomía patológica especial veterinaria". Ed Acribia, S. A. Zaragoza. España.
5. MESTORINO, O.N. (1993). Estudio Farmacocinético Del Tianfenicol En Vacas Lecheras Holando Argentino. "Tesis". Cátedra de Farmacología Farmacotecnia y Terapéutica. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.P.
6. TORRES MORENO, A. (1965b)"La mastitis bovina". Revista de Medicina Veterinaria. vol 147 (2):134-138.
7. SALAM, A. (1987) "Mastitis Bovina: enfermedades de la ubre y su control en Israel". Rosenbusch Técnica: 3-41.
8. ERRECALDE, J. O. (1996). Antimicrobianos en leche. Su importancia en salud pública. Boletín de divulgación pública. Laboratorio Boehringer Ingelheim.
9. ERRECALDE, J. O. (2000). "Utilización de nuevos antibióticos y otras drogas para eliminar infecciones durante la lactancia y periodo seco". 2do Curso de actualización Profesional. UNLP; INTA; CREA.
10. CORBELLINI, C. N. (2000b). "El complejo de las Mastitis Bovinas, Anatomía". 2do Curso de actualización Profesional. UNLP; INTA; CREA.
11. LE TALEC, J.Y. (1981) "Actualités bibliographiques a porpos du traitement des mammites et de la détection des résidus d'antiinfectieux dans le lait". Rec. Méd.Vet. 157(2):225-236.
12. ZIV, G. (1980) "Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy; 1. Parenteral treatment; 2.Practical and therapeutic applications; 3. Intramammary treatment". Veterinzky Medicine Small Animal Clinician 277-290, 469-474, 657-670.
13. BAGGOT, J.D.(1986) "Principios de farmacología clínica veterinaria". Ed. Acribia. S.A. Zaragoza (España).
14. RASMUSSEN, F. (1966)."Studies on the mammary excretion and absorption of drugs". Copenhagen, Carl Fr. Martensen.
15. ZIV, G.; BOGIN, E.; SULMAN, F.G. (1972) "Blood and milk levels of chloramphenicol in normal and mastitic cows and ewes after intramuscular administration of chloramphenicol and chloramphenicol sodium succinate". Zbl.Vet.Med.A. 20:801-811.

16. ZIV, G.; GORDIN, S.; BECHAR, G. (1974) "Mode of transfer of antibiotics from treated to non treated quarters in dairy cows". *Am.J.Vet.Res.* 35(5):643-647.
17. ZIV, G.; SULMAN, F.G. (1973) "Penetration of lincomycin and clindamycin into milk in ewes". *Brit.Vet.J.* 129:83-91.
18. RASMUSSEN, F. (1971). "Excretion of drugs by milk". In. *Hand Book of experimental Pharmacology*, vol 28. Part. 1. Brodie, B.B. and J.R. Gillette, editors. Springer, New York, N.Y. 390-402.
19. BOUCHOT, M.C. (1981). "Facteurs influencant l'excretion des antibiotiques par le lait". *Rec.Méd.Vét.* 157 (2):191-197.
20. BLOBEL, H.; BURCH, C.W. (1960) "Concentrations of penicillin in milk of cows following intramuscular administration". *J.A.V.M.A.* 136:477-480.
21. WRIGHT, W.W.; HAROLD, L.C. (1960). "Antibiotic residues in milk". *J. A. V. M. A.* 137: 525-533.
22. BURGAT-SACAZE, V.; PETIT, C.L. (1983). "Antibiotherapie intramammaire: Notions pratiques de pharmacocinétique". *Rec. Méd.Vét.* 159 (6):561-573.
23. MERCER, H.D.; GELETA, J.N.; BALDWIN, R.A.; SHIMODA, W. (1976)"View point and current concepts regarding accepted and tried products for control of bovine mastitis". *J.A.V.M.A.* 169:1104-1114.
24. SCHADEWINKEL-SCHERKL, A.M.; RASMUSSEN, F.; MERCK, C.C.; NIELSEN, P.; FREY, H.H. (1993). Active Transport of Benzylpenicillin Across the Blood-Milk Barrier. *Pharmacology & Toxicology*, 73: 14-19.
25. BRANDER, G.C.; PUGH, D.M.; BYWATER, R.J.; JENKINS, W.L. (1991). *Veterinary Applied Pharmacology Therapeutic*. Fifth Edition. Bailliere Tindall, Great Britain.
26. BAGGOT, J.D. (1977). *Principles of drugs disposition: the basis of veterinary clinical pharmacology*. Saunders, W.B. Philadelphia.
27. BOOTH, N.H. & MCDONALD, L.E. (1992). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
28. DUNN, C.J.; BARRADELL, L.B. (1996). Azithromycin: A Review of its Pharmacological Properties and Use as 3-Day Therapy in Respiratory Tract Infections. *Drugs.* 51(3):483-505.
29. BRIGHT, G.M.; NAGEL, A.A.; BORDNER, J.; DESAI, K.A.; DIBRINO, J.N. (1998). Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-deoxy-9^a-AZA-9^a-homoerythromycin A derivatives: a new class of macrolide antibiotics, the azalides. *Journal of Antibiotics.* 41:1029-1047.
30. DJOKIC, S.; KOBREHEL, G.; LAZAREVSKI, G. (1987). Erithromycin series XII antibacterial in vitro evaluation of 10-dihydri-10-deoxy11-azaerythromycin A:

- synthesis and structure-activity relation-ship of its acyl derivatives. *Journal of Antibiotics*. 40:1006-1015.
31. SHEPARD RM.; FALKNER, FC. (1990). Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 25, Suppl. A, 49-60.
 32. PETERS, D.H.; FRIEDEL, H.A.; MCTAVISH, D. (1992). Azithromycin; A Review of Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy. *Drugs* 44 (5): 750-799.
 33. TREADWAY,G. (2001). Azithromycin: a new 15-membered macrolide. *Jpn J Antibiotic*. Feb; 54 Suppl A: 70-6.
 34. LO JB, APPEL LE, HERBIG SM, MCCRAY SB, THOMBRE AG. (2009). Formulation design and pharmaceutical development of a novel controlled release form of azithromycin for a single-dose therapy. *Drug Development Industrial Pharmaceutical*. Dec; 35(12): 1522-9.
 35. BERGOGLIO, R. (1993). "Antibióticos". Quinta edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, España. pg. 201-212.
 36. PECHERE, J.C. (1991). The activity of azithromycin in animal models of infection. *European Journal Clinical Microbiology Infections Disease*. 10 (10):821-827.
 37. STOTT, G.A. (1992). New macrolide antibiotics: clarithromycin and azithromycin. *Am Fam Physician*. 46(3):863-869.
 38. PURI, SK.; SINGH, N. (2000). Azithromycin: antimalarial profile against blood- and sporozoite-induced infections in mice and monkeys. *Experimental Parasitology*. Jan. 94; (1): 8-14.
 39. DURAN, JM.; AMSDEN, GW. (2000). Azithromycin: indications for the future? *Expert Opinion Pharmacotherapeutics*. Mar; 1 (3): 489-505
 40. VIAL HJ, GORENFLOT A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*. May 31;138(1-2):147-60.
 41. AMSDEN GW, GREGORY TB, MICHALAK CA, GLUE P, KNIRSCH CA. (2007). Pharmacokinetics of azithromycin and the combination of ivermectin an albendazole when administered alone and concurrently in healthy volunteers. *American Journal Tropical Medicine Hyg*. Jun;76(6):1153-7.
 42. MCDONALD, P.J.; CRAIG, W.A.; KUNIN, C.M. (1977). Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* exposure for limited periods of time. *Journal of infectious Disease*, 135: 217-223.
 43. DEBBIA, E.A.; MOLINARI, G.; PAGLIA, P.; SCHITO, G.C. (1990). Post-antibiotic effect of azithromycin on respiratory tract pathogens. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 16: 615-619.

44. NEU, H.C. (1990). Antibacterial therapy: problems and promises, part II. Hospital Practice, 23: 181-194.
45. PECHERE, J.C. (1995). Effect of molecular structure of azithromycin on pharmacokinetics and the antimicrobial activity. Pathol biol (Paris). 43(6):483-487.
46. GIRARD, A.E.; GIRARD, D.; ENGLISH, A.R.; GOOTZ, T.D.; CIMOCHOWSKI, C.R.; FAIELLA, J.A.; HASKELL, S.L.; RETSEMA, J.A. (1987). Pharmacokinetic and In Vivo Studies With Azithromycin (CP-62,993), a New Macrolide With an Extended Half-Life and Excellent Tissue Distribution. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31(12):1948-1954.
47. SIGLAS, E. (1995). Clinical pharmacokinetics of azithromycin. Pathol Biol (Paris). 43(6):505-511.
48. GARVER E, HUGGER ED, SHEARN SP, RAO A, DAWSON PA, DAVIS CB, HAN C. (2008). Involvement of intestinal uptake transporters in the absorption of azithromycin and clarithromycin in the rat. Drug Metabolism Disposition. Dec;36(12):2492-8.
49. JOHNSON, R.B. (1990). Azithromycin in the treatment of acute lower respiratory tract infections. Abstract. Proceeding of the 6th International Congress of Infectious Diseases, Montreal.
50. LODE, H. (1991). The pharmacokinetics of azithromycin and their clinical significance. European Journal Clinical Microbiology Infections Disease. 10 (10):807-812.
51. FOULDS, G.; CHAN, K.H.; JOHNSON, J.T.; SHEPARD, R.M.; JOHNSON, R.B. (1991). Concentrations of azithromycin in human tonsillar tissue. European Journal Clinical Microbiology Infections Disease. 10 (10):853-856.
52. CARCELES CM, FERNÁNDEZ-VARÓN E, MARIN P, ESCUDERO E. (2006). Tissue disposition of azithromycin after intravenous and intramuscular administration to rabbits. Veterinary Journal. Jul;174 (1):154-9.
53. BERGOGNE-BEREZIN, E. (1995). Azithromycin: tissue pharmacology. Pathol Biol (Paris). 43(6):498-504.
54. HEIKKINEN, T.; LAINE, K.; NEUVONEN, P.J.; EKBLAD. (2000). The transplacental transfer of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin and azithromycin. BJOG, Jun; 107 (6): 770-5.
55. RAMSEY PS, VAULES MB, VASDEV GM, ANDREWS WW, RAMIN KD. (2003). Maternal and transplacental pharmacokinetics of azithromycin. American Journal of Obstetric Gynecology. Mar;188(3):714-8.

56. FIETA, A.; MERLINI, C.; GIALDRONI GRASSI, G. (1997). Requiriments for intracellular accumulation and release of clarithromycin and azithromycin by human phagocytes. *Journal Chemother.* 9(1):23-31.
57. LAUFEN, H.; WILDFEUER, A.; LACH, P. (1990). Mechanism of azitromycin uptake in human polymorphonuclear leucocytes. *Arzneimittelforschung jun*; 40 (6): 686-9
58. HAND WL, HAND DL. (2001). Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes. *International Journal of Antimicrobial Agents.* Nov; 18(5):419-25.
59. HOFFLER, D.; KOEPPE, P.; PAESKE, B. (1995). Pharmacokinetics of azithromycin in normal and impaired renal function. *Infection.* 23(6):356-361.
60. ALVAREZ-ELCORO, S.; ENZLER, MJ. The macrolides: erytromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin Proc, jun* 74; (6): 613-34.
61. VAN BAMBEKE F, TULKENS PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents* 2001, 18:S17-S23.
62. ANDES D, CRAIG W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect Dis Clin N Am* 1998; 112:849-860.
63. JACOBS MR. Building in efficacy: developing solutions to combat drug-resistant *S. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:18-27.
64. NOVELLI A, FALLAN S, CASSETTE MI, ARRIGUCCI S, MAZZEI T. In vivo pharmacodynamic evaluation of clarithromicin in comparison to erytromicin. *J Chemother* 2002; 14:584-590.
65. AMBROSE, P., BHAVNANI, S., RUBINO, C., LOVIE, A., GUMBO, T., FORREST, A. AND DRUSANO, G. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic of antimicrobial therapy: Its not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2004; 44:79-86.
66. MAZZEI T, NOVELLI A. How macrolide pharmacodynamics affect bacterial killing. *Infections in Medicine* 1999; 16:22-28.
67. CROTEAU, D.; VALLEE, F.; BERGERON, M.G.; LEBEL, M. (1987). High-performance liquid chromatographic assay of erithromycin and its esters using electrochemical detection. *Journal of Chromatography.* 419:205-212.
68. SHEPARD, R.M. (1987). High pressure liquid chromatographic (HPLC) assay for azithromycin (CP-62p#993/XZ-450) in serum and tissues. Abstract. Proceedings of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October 1987.

69. FIESE, E.F.; STEFFEN, S.H. (1990). Comparative of the acid stability of azithromycin and erythromycin. *American Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 25(A):39-47.
70. KOVACIC-BOSNJAK.; MARINCEL, J.; LOPOTAR, N.; KOBREHEL, G. (1988). Reversed-phase HPLC analysis of the semisynthetic macrolide antibiotic azithromycin. *Chromatographia*. 25:999-1003.
71. RIEDEL, K.D.; WILDFEUER, A.; LAUFEN, H.; ZIMMERMANN, T. (1992). Equivalence of high-performance liquid chromatographic assay and bioassay of azithromycin in human serum samples. *Journal of Chromatography*, 576: 358-362.
72. PRESCOTT, J. F. & BAGGOT, J. D. 1988. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ed. Blakwell Scientific Publications Limited, Oxford.
73. NOTARI, R. 1987. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. Ed. Marcel Dekker Inc., New York.
74. GIBALDI, M. 1991. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. Ed. Lea & Febiger, Pennsylvania.
75. Note for Guidance on The Investigation of Bioavailability and bioequivalence. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; Evaluation of Medicines for Human Use. CPMP/EWP/QWP/1401/98. London, 26 July 2001.
76. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica) normativa n° 5040/06. Régimen de Buenas Prácticas para la Realización de Estudios de Biodisponibilidad / Bioequivalencia.
77. FDA (Food and Drug Administration). Guidance for Industry: Bioequivalence Guidance. US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologic Evaluation and Research (CBER). September 1998 ICH.
78. CÁRCELES CM, FONT A, ESPUNY A, FERNÁNDEZ-VARÓN E, SERRANO JM, ESCUDERO E. (2005). Pharmacokinetics of azithromycin after intravenous and intramuscular administration in goats. *J Vet Pharmacol Ther*; 28:51-55.
79. DAVIS JL, GARDNER SY, JONES SL, SCHWABENTON BA, PAPICH MG. (2002). Pharmacokinetics of azithromycin in foals after IV and oral dose and disposition into phagocytes. *J Vet Pharmacol Ther*; 25:99-104
80. MASCELLINO MT, IONA E, PONZO R, MASTROIANNI CM, DELIA S. (1994). Infections due to *Rhodococcus equi* in three HIV-infected patients: microbiological findings and antibiotic susceptibility. *Int J Clin Pharmacol Res*; 14:157-163.

81. HUNTER RP, LYNCH MJ, ERICSON JF, MILLAS WJ, FLETCHER AM, RYAN NI, OLSON JA. (1995). Pharmacokinetics, oral bioavailability and tissue distribution of azithromycin in cats. *J Vet Pharmacol Ther*; 18: 38-46.
82. BALLOW C.H. & AMSDEN, G.W. (1992). Azithromycin: the first azalide antibiotic. *The Annals of Pharmacotherapy*, 26, 1253-1261.
83. LALAK, N.J. & MORRIS D.L. (1993). Azithromycin clinical pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 25, 370-374.
84. LUCAS, M.F; ERRECALDE, J. O; MESTORINO, N. (2009). Pharmacokinetics of lactating cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 33, 132-140.
85. SUAREZ-MIER, G; GIGUERE, S; LEE, E.A. (2007). Pulmonary disposition of erythromycin, azithromycin, and clarithromycin in foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30, 109-115.
86. CÁRCELES CM, FONT A, ESPUNY A, FERNÁNDEZ-VARÓN E, SERRANO JM, ESCUDERO E. (2005). Pharmacokinetics of azithromycin after intravenous and intramuscular administration to sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 28:475-479.
87. FOULDS G, SHEPARD RM, JOHNSON RB. (1990). The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother*; 25:73-82.
88. SARAGLU, M; ISMAILOS, G; TRYFON, S; LIAPAKIS, I; PAPALOIS, A; BOUROS, D. (2010). Penetration of azithromycin in experimental pleural empyema fluid. *Eur Journal Pharmacology*. Jan 25; 626 (2-3): 271-5.
89. FANG, A.F; PALMER, J.N; CHIU, A.G; BLAUMER, J.L; CROWNOVER, P.H; CAMPBELL, M.D; DAMLE, B.D. (2009). Pharmacokinetics of azithromycin in plasma and sinus mucosal tissue following administration of extended-release or immediate-release formulations in adult patients with chronic rhinosinusitis. *Int Journal Antimicrobial Agents*. Jul; 34 (1): 67:71.
90. LUCCHI, M; DAMLE, B; FANG, A; DE CAPRATIS, P.J; MUSSI, A; SANCHEZ, S.P.; PASQUALETTI, G ; DEL TACCA, M. (2008). Pharmacokinetics of azithromycin in serum, bronchial washings, alveolar macrophages and lung tissue following a single oral dose of extended or immediate release formulations of azithromycin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. Apr; 61 (4): 884:91.

91. LUREV, S; EVTUSHENKO, I.D; OGORODOVA, L.M. (2004). Azithromycin levels in the chorion tissue within the first three months on the pregnancy term. *Antibiotic Khimioterapi*. 49 (10): 10-2.
92. REUTEMANN, S.H. FORMENTINI, E.A. (2003). Análisis farmacocinético y administración extravascular; errores comunes en el calculo y la interpretación de los parámetros farmacocinéticos. *Revista FAVE, Ciencias Veterinarias*, 2 (2).
93. ZITHROMAX® PFIZER INC. Description for azithromycin tablets, azithromycin capsules, azithromycin for oral suspension and azithromycin for intravenous infusion. 70-5179-00-8
94. GROVE D, RANDALL W. (1955). *Assay Methods of Antibiotics*. New York, USA: Medical Encyclopedia Inc,
95. UNITED STATED PHARMACOPEIA CONVENTION. *The Nacional Formulary Mack Printing*. USA: (USP XXVII) 2004; 859-861, 2163-2169
96. GIL-ALEGRE E. *Materia prima y Producto Terminado: Protocolo de Validación de Métodos Analíticos*. Facultad de Farmacia. Madrid; 1995.
97. DAVILA, D. & KOLACNY-BABIC, I. (1991) Pharmacokinetics of azithromycin after single oral dosing of experimental animals. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 12: 505-514
98. JACKS, S., GIGUERE, S., GRONWALL, P.R., BROWN, M.P. & MERRITT, K.A. (2001). Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and broncoalveolar cells in foals. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 1870-1875.
99. MESTORINO, N., MONCADA CÁRDENAS, A.L., DANIELE, M., VALLE, C., ERRECALDE, J.O. (2010) Perfil de eliminación de tilosina en leche tras su administración intramuscular. Cálculo del tiempo de retirada. *Revista del Colegio de veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, 45: 74-80.
100. BAJWA, N.S., B.K. BANSAL, A.K. SRIVASTAVA AND R. RANJAN. (2007). Pharmacokinetic Profile of erythromycin after intramammary administration in lactanting cows with specific mastitis. *Veterinary Research Communications*, 31: 603-610.

101. ZIV, G., M. SHEM-TOV, A. GLICKMAN, M. WINKLER, A. SARAN. (1995) Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J.Vet. Pharmacol.Therap.* 18, 340-345.
102. EVANS, N.A. (2005) Tulathromycin: An overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Veterinary therapeutics*, vol 6(2):83-95
103. COOK J.A., RANDINITIS E.J., BRAMSON C.R., AND WESCHE D.L. (2006) Lack of a pharmacokinetic interaction between azithromycin and chloroquine, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(3), pp. 407–412
104. BURROWS G.E., GRIFFIN D.D., PIPPIN A., HARRIS K. (1989). A comparison of the various routes of administration of erythromycin en cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 12, 289-295.
105. BENCHAOUI H.A., NOWAKOWSDI M., SHERINGTON J., ROWAN T.G., SUNDERLAND S.J. (2004) Pharmacokinetics and lung tissue concentration of tulathromycin in swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 203-210.
106. YAMAOKA K., NAKAGAWA T. & UNO T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokinetics Biopharmacy*, 6, 165-175.
107. MCCONNELL, S.A. (1999). Review and comparison of advanced-generation macrolides clarithromycin and dirithromycin. *Pharmacotherapy Publication*, 19, 404-415.
108. MULAZIMOGLU, L.; TULKENS, P.M.; VAN BAMBEKE, F. (2005) Macrolides. In *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Vol II: Antimicrobial Agents*. Eds Yu, V.L., Edwards, G., McKinnon, P.S., Peloquin, C. & Mors, G.D., pp. 243-283. Esun Technologies, Pittsburg, USA.
109. LABRO, M.T. (1998). Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *The journal of Antimicrobial chemotherapy*, 41 (supp B), 37-46.
110. SHRYOCK, T.R., MORTENSEN, J.E. & BAUMHOLTZ, M. (1998). The effects of macrolides on the expression of bactericidal virulence mechanisms. *The journal of antimicrobial chemotherapy*, 41, 505-512.

111. GRUET P, MAINCENT P, BERTHELOT X, KALTSATOS V. (2001) Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*; 50:245-259.
112. MATTIE H, ZHANG L, VAN STRIJEN E, SEKH BR, DOUWES-IDEMA AEA. (1997) Pharmacokinetic and pharmacodynamic models of the antistaphylococcal effects of meropenem and cloxacillin in vitro and in experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:2038-2088.
113. ZIV G. (1980) Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy: Parenteral treatment. *Vet Med Small Anim*; 75:277-290.

X. ANEXOS

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS REPORTADOS POR OTROS AUTORES

Parametros	Peters	Foulds	Pfizer	Lucas	Suarez	Carceles	Carceles	Carceles
Referencia	32	87	93	84	85	78	86	52
Especie	Human	Human	Human	Bov	potrillo	cabra	oveja	conejo
Via	oral	Oral	IV	Im	Oral	IV / IM	IV / IM	IV / IM
Dosis	500mg	500mg	1000-4000	10mg/kg	10mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg	10mg/kg
Cl			610	3295+-1255		850	520	
λ_z (1/h)								
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	10-40	8-40		14+-11	25,7+-15	32,5 / 45,2	47,7 / 61,2	21,8 / 23,1
T_{max} (h)	2,5			2			/ 1,24	
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0,4	0,4	3,63+-1,6	0,18		/ 0,64	/ 1,26	
$AUC_{0-t_{last}}$ (h. $\mu\text{g/ml}$)	3,39	3,39	9,6+-4,8	3,39+-1,23			38,8 / 36	
F (%)*	37	37				/ 92,2	/ 94,1	
Vd	23-30		33,3			34,5 /	34,5 /	
$MRT_{0-t_{last}}$ (h)				26,74+-16		40,1 / 60,3	40,1 / 60,3	

CONCENTRACIONES EN TEJIDOS REPORTADAS POR OTROS AUTORES

Parámetros	Pfizer	Lurev	Suarez	Foulds	Peters	Carceles	Turic
Referencia	93	91	85	87	32	52	
Especie	Human	Human	Potrillo	Human	Human	conejo	Terneros
Vía de administración	oral	oral	Oral	oral	oral	IM	IM
Dosis	500mg	500mg	10mg/kg	500mg	500mg	10mg/kg	10mg/kg
Tiempo	Cmax	Cmax	Cmax	Cmax	Cmax	Cmax	Cmax
Piel	0,4						
Fluido pulmonar			10,0	1 a 9	1,56 – 2,18		
Epitelio bronquioalveolar			49,92 +- 26,94	1 a 9	4,74		
Hígado						36,67	4,08
Músculo				0,2 a 1		2,98	3,24
Corazón						19,83	
Riñón						8,43	29,90
Grasa				0,2 a 1			2,40
Pulmón	4,0			1 a 9	3,9	10,01	31,73
Bazo						22,48	
Tonsilas	4,5			1 a 9			
Cerebro							0,61
Útero	2,8			1 a 9			
Ovarios				1 a 9			
Trompas de Fallopio				1 a 9			
Próstata				1 a 9			
Testículo				1 a 9			32,00
Corion		4,6					
Hueso				0,2 a 1			
Bilis						39,75	
Espuito	2,9						

Valores expresados en µg/mL o en µg/gr