

TESI DOCTORAL

**COMPORTAMENT FARMACOCINÈTIC I
DEPLECIÓ TISULAR DE LA TILOSINA EN
VEDELLS I PORCS**

CARME PRATS FUXET

Ara que ja arriba el final d'aquest llarg camí, de més de quatre anys de treball de recerca, és hora de mirar enrera i fer balanç de totes les experiències viscudes i de passar revista a tota aquella gent, que s'ha implicat d'una manera o altra posant el seu granet de sorra en la consecució d'aquest treball.

En primer lloc, voldria expressar el meu agraïment a les meves directores de tesi, Marga Arboix i Belén Pérez per encoratjar-me un dia de l'any 1996 a iniciar aquest treball: la Marga, oferint-me l'oportunitat d'ampliar la meva formació i aprofundir en els coneixements farmacològics i la Belén, amb el seu optimisme i savis consells, donant-me sempre aquella empenta per continuar endavant.

Voldria agrair especialment al personal del Servei d'Anàlisi de Fàrmacs (Magda, Glòria, Pilar, Ghizlane), per haver-me brindat sempre el seu desinteressat ajut i haver compartit amb mi tantes hores de treball dins i fora del laboratori.

A en Ramón Francesch, de l'empresa LABIANA Life Sciences per voler participar en el conveni Empresa-Ministeri de Ciència i Tecnologia que va fer possible que se'm atorgués la beca de la qual he estat beneficiaria durant aquest període de temps.

A les companyes i tècnics que m'han ajudat en la feixuga tasca de manipular animals i de prendre mostres, especialment a en Paco i a la Glòria, als qui dono les gràcies per les repetides matinades que van haver de fer per poder realitzar una part d'aquest estudi.

En general, un sentit reconeixement a tota la gent del Departament de Farmacologia tant del temps passat com del present, amb els que he conviscut tant de temps.

També vull donar gràcies a totes aquelles persones properes, amics i coneguts, l'interès mostrat durant aquests anys per l'evolució d'aquest treball.

Finalment, recordar i agrair tot el recolzament demostrat per la meva família, en especial la meva mare i la meva germana, les quals han compartit amb mi totes les alegries i totes les penes durant tot aquest temps. A en Marcel, sempre disposat a escoltar-me i a fer-me veure les coses amb una mica d'humor. I per acabar, a la meva filla Júlia , que va nèixer en el moment que més la necessitava i des de llavors és l'alegria de la meva vida.

A la memòria
del meu pare

Cada dia aprenia alguna cosa
més del planeta, de la marxa,
del viatge. Tot anava venint a
poc poc, a l'atzar de les
reflexions.

(El PetitPríncep,
Antoine de Saint
Exupéry)

ÍNDICE

ÍNDEX	i
ABREVIATURES	viii
I. INTRODUCCIÓ	1
1.1. ANTIBIÒTICS MACRÒLIDS. GENERALITATS.....	15
1.1.1. Evolució històrica	15
1.1.2. Característiques físico-químiques. Classificació.	16
1.1.3. Activitat antimicrobiana.....	18
1.1.4. Mecanisme d'acció	20
1.1.5. Resistències.....	22
1.1.6. Característiques farmacocinètiques.....	23
1.1.7. Interaccions farmacològiques	26
1.2. TILOSINA. GENERALITATS.....	28
1.2.1. Descobriments	28
1.2.2. Característiques físico-químiques	28
1.2.3. Activitat antimicrobiana.....	29
1.2.4. Formes farmacèutiques d'administració	32
1.2.5. Característiques farmacocinètiques.....	32
1.2.6. Interaccions farmacològiques	35
1.2.7. Reaccions adverses	35
1.2.8. Indicacions terapèutiques.....	36
1.2.9. Contraindicacions.....	37
1.2.10. Estudis de depleció de residus de tilosina.....	38
II. OBJECTIUS	40
III. MATERIAL I MÈTODES	44
3.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I PORCS.....	44
3.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells.....	46
3.1.1.1. Estudi pilot	46
3.1.1.1.1. Fàrmac utilitzat	46
3.1.1.1.2. Animals.....	46
3.1.1.1.3. Protocol experimental.....	47

3.1.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina després de ser administrada per via iv i im ..	47
3.1.1.2.1. Fàrmac utilitzat	47
3.1.1.2.2. Animals.....	48
3.1.1.2.3. Protocol experimental.....	48
3.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs	49
3.1.2.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina després de ser administrada per via iv i im	49
3.1.2.1.1. Fàrmac utilitzat	49
3.1.2.1.2. Animals.....	49
3.1.2.1.3. Protocol experimental.....	50
3.1.3. Anàlisi farmacocinètica.....	51
3.1.4. Anàlisi estadística	53
3.1.5. Càlcul de l'eficàcia terapèutica	53
3.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAMUSCULAR A VEDELLS I PORCS	55
3.2.1. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en vedells.....	55
3.2.1.1. Fàrmac utilitzat	55
3.2.1.2. Animals.....	55
3.2.1.3. Protocol experimental	55
3.2.2. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en porcs	56
3.2.2.1. Fàrmac utilitzat	56
3.2.2.2. Animals.....	56
3.2.2.3. Protocol experimental.....	57
3.2.3. Càlcul del temps d'espera	57
IV. RESULTATS.....	59
4.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I PORCS.....	61
4.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells.....	61
4.1.1.1. Estudi pilot	61
4.1.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina després de ser administrada per via iv i im	63
4.1.1.3. Anàlisi estadística dels resultats	75
4.1.1.4. Càlcul de l'eficàcia terapèutica pels diferents microorganismes causants de malalties en vedells.	76

4.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs	77
4.1.2.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina després de ser administrada per via iv i im	77
4.1.2.2. Anàlisi estadística dels resultats	87
4.1.2.3. Càlcul de l'eficàcia terapèutica pels diferents microorganismes causants de malalties en porcs.	87
4.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ PER VIA INTRAMUSCULAR.....	89
4.2.1. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en vedells després de ser administrada per via intramuscular	89
4.2.1.1. Càlcul del temps d'espera.....	91
4.2.2. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en porcs després de ser administrada per via intramuscular	92
4.2.2.1. Càlcul del temps d'espera.....	93
V. DISCUSSIÓ	95
5.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I PORCS.....	97
5.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells després de ser administrada per via intravenosa i intramuscular	97
5.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs després de ser administrada per via intravenosa i intramuscular	104
5.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ PER VIA INTRAMUSCULAR	108
5.2.1. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en vedells després de ser administrada per via intramuscular	108
5.2.2. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en porcs després de ser administrada per via intramuscular	111
VI.CONCLUSIONS.....	115
VII. BIBLIOGRAFIA	119
VIII. ANNEX 1: MÈTODES ANALÍTICS.....	135
8.1. MÈTODE ANALÍTIC PER A LA DETERMINACIÓ DE TILOSINA	137
8.1.1. Introducció	137
8.1.1.1. Antecedents	137
8.1.1.1.1. Mètodes analítics de la tilosina en plasma.....	137

8.1.1.1.2. Mètodes analítics de la tilosina en teixits i pinso.....	138
- Mètodes microbiològics.....	138
- Mètodes cromatogràfics.....	138
8.1.1.2. Validació del mètode analític	140
8.1.1.2.1. Definicions.....	140
8.1.1.2.2. Càlcul dels paràmetres	142
A Selectivitat i especificitat	142
B Linealitat.....	142
C Precisió	142
D Exactitud	143
E Límit de quantificació	143
F Límit de detecció	144
G Estabilitat.....	144
8.1.2. OBJECTIUS	144
8.1.3. MATERIAL I MÈTODES.....	145
8.1.3.1. Material i mètode analític de la tilosina en plasma	145
8.1.3.1.1. Substàncies utilitzades	145
8.1.3.1.2. Material de laboratori	145
8.1.3.1.3. Aparells.....	145
8.1.3.1.4. Solucions patró	146
a Solucions patró primàries.....	146
b Solucions patró secundàries.....	146
8.1.3.1.5. Altres solucions	146
8.1.3.1.6. Condicions cromatogràfiques	146
8.1.3.1.7. Procediment d'extracció de la tilosina a partir de mostres de plasma	147
8.1.3.2. Validació del mètode analític de la tilosina en plasma.....	148
8.1.3.2.1. Selectivitat i especificitat.....	148
8.1.3.2.2. Linealitat.....	148
8.1.3.2.3. Precisió i exactitud.....	149
8.1.3.2.4. Límit de quantificació.....	149
8.1.3.2.5. Límit de detecció	149
8.1.3.2.6. Estabilitat	149
8.1.3.3. Material i mètode analític de la tilosina en teixits.....	150
8.1.3.3.1. Substàncies utilitzades	150
8.1.3.3.2. Material de laboratori	150
8.1.3.3.3. Aparells.....	151
8.1.3.3.4. Solucions patró	151

8.1.3.3.5. Altres solucions	151
8.1.3.3.6. Condicions cromatogràfiques	152
8.1.3.3.7. Procediment d'extracció de la tilosina a partir de mostres de teixits	152
8.1.3.4. Validació del mètode analític de la tilosina en teixits	156
8.1.3.4.1. Selectivitat i especificitat	156
8.1.3.4.2. Linealitat	156
8.1.3.4.3. Precisió i exactitud.....	157
8.1.3.4.4. Límit de quantificació.....	157
8.1.3.4.5. Límit de detecció	158
8.1.3.4.6. Estabilitat	158
8.1.4. RESULTATS.....	159
8.1.4.1. Validació del mètode analític de la tilosina en plasma.....	159
8.1.4.1.2. Selectivitat i especificitat	159
8.1.4.1.3. Linealitat	161
8.1.4.1.4. Precisió i exactitud.....	161
8.1.4.1.5. Límit de quantificació.....	162
8.1.4.1.6. Límit de detecció	162
8.1.4.1.7. Estabilitat	163
8.1.4.2. Validació del mètode analític de la tilosina en teixits	163
8.1.4.2.1. Selectivitat i especificitat	163
8.1.4.2.2. Linealitat	173
8.1.4.2.3. Precisió i exactitud.....	173
8.1.4.2.4. Límit de quantificació.....	174
8.1.4.2.5. Límit de detecció	175
8.1.4.2.6. Estabilitat	176
8.1.5. DISCUSSIÓ.....	177
8.1.5.1. Mètode analític de la tilosina en plasma.....	177
8.1.5.2. Mètode analític de la tilosina en teixits i pinso	177

IX.ANEX 2: PUBLICACIONS 181

- Prats, C., Francesch, R., Arboix, M. i Pérez, B. (2002) "Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* **766**, 57-65.
- Prats, C., El Korchi, G., Francesch, R., Arboix, M. i Pérez, B. (2002) "Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly to pigs". *Res. Vet. Sci.* **73**, 141-144.

ÍNDEX

- Prats, C., El Korchi, G., Francesch, R., Arboix, M. i Pérez., B. (2002) "Tylosin depletion from edible pig tissues" *Res. Vet. Sci.* **73**, 323-325.

ABREVIATURES

ABZ	Albendazol
AUC	Àrea sota la corba
AUMC	Àrea sota la corba del producte dels nivells plasmàtics pel temps
C_{\max}	Concentració màxima
CCP	Cromatografia de capa fina
CG-EM	Cromatografia de gasos - espectrometria de masses
Cl	Aclariment plasmàtic
CL-EM	Cromatografia líquida - espectrometria de masses
CLAE	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
CMB	Concentració mínima bactericida
CMI	Concentració mínima inhibidora
CV	Coefficient de variació
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products
D.E.	Desviació estàndard
IDA	Ingesta diària acceptable
EFS	Extracció en fase sòlida
EPA	Efecte postantibiòtic
EMA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ERM	Error relatiu mitjà
F	Biodisponibilitat
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenosa
LMR	Límit màxim de residus
LD	Límit de detecció

LD ₅₀	Dosi letal 50
LQ	Límit de quantificació
MAT	Temps mitjà d'absorció
MRT	Temps mitjà de residència
NOEL	Dosi sense efecte observat
PK/PD	Farmacocinètica/Farmacodinàmia
S	Pendent mitjà
t _{max}	Temps de concentració màxima
TRIS	Hidroximetilaminometà
t _{1/2β}	Temps de vida mitjana d'eliminació
UV	Ultraviolat
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products
Vd _{àrea}	Volum de distribució d'àrea
Vd _{ss}	Volum de distribució en l'estat d'equilibri estacionari

I. INTRODUCCIÓ

El desenvolupament de nous fàrmacs i de noves formes farmacèutiques requereix la realització d'una sèrie d'estudis previs per a autoritzar-ne l'ús, que donin informació suficient sobre el comportament farmacocinètic i farmacodinàmic de les molècules i així conèixer l'eficàcia i la seguretat del seu ús en animals i/o en humans.

El coneixement de paràmetres com la biodisponibilitat, és a dir, la capacitat del fàrmac per accedir a la sang des del compartiment on ha estat administrat constitueix una part important d'aquest estudi, perquè ens permet comparar vies d'administració i formes farmacèutiques diferents. De la mateixa manera, els estudis de depleció de residus ajuden a conèixer les afinitats tissulars dels fàrmacs, la quantitat en què s'acumulen en els diferents teixits, com s'eliminen d'aquests al llarg del temps i a partir de quin temps postadministració consumir-los no representa cap perill per a la salut.

Els fàrmacs que s'utilitzen per a tractar els animals productors d'aliments poden arribar als consumidors a través de la cadena alimentària i tenir conseqüències negatives per a la salut pública.

L'avaluació d'aquest risc ha portat a l'establiment de sistemes de control per garantir que els aliments siguin segurs. Al llarg del temps s'han introduït mecanismes de control per avaluar el risc dels diferents contaminants ambientals (pesticides, metalls, etc.) i altres substàncies utilitzades en el tractament de patologies animals que a través de la cadena alimentària poden arribar a l'home.

Al final de 1981, es presenten a la CEE les primeres directrius en relació amb els medicaments d'ús veterinari. El 1990 apareix a Europa la primera directriu (Reglament (CE) 2377/90, 1990) que fixa els criteris per establir els límits màxims de residus acceptables per a cada molècula i/o els seus metabolits, susceptibles de ser utilitzats en terapèutica animal sense risc per a la salut del consumidor.

L'avaluació de la seguretat dels additius i contaminants dels aliments s'ha basat en la determinació d'un nivell sense efecte (NOEL) per a cada substància i l'establiment de factors de seguretat que permetin fixar una quantitat de substància activa que en ser ingerida diàriament per l'home no impliqui cap risc per a la seva salut.

Aquests límits de residus tolerables són fixats per a tots aquells teixits que formen part de la dieta habitual, tenint en compte un consum diari d'aliments d'origen animal caculat per a una persona d'un pes mitjà de 60 kg. A partir de la fixació d'aquest límit per a cada teixit, es pot establir per a cada especialitat farmacèutica, el temps necessari perquè cadascuna de les substàncies actives i/o metabolits presents en l'organisme de l'animal tractat arribin a nivells sense risc per a la salut del consumidor (temps d'espera).

Aquests nivells són fixats per comitès d'experts després d'avaluar rigorosament les dades procedents dels estudis de toxicitat realitzats amb cada molècula, els seus metabolits i/o els productes de degradació.

Així, quan un fàrmac és administrat a un animal productor d'aliments, aquest arriba a la sang i es distribueix als teixits. Els nivells de fàrmac que es troben en cadascun dels teixits que es destinaran al consum humà poden

suposar un risc per a la salut del consumidor, per la qual cosa es fa necessari conèixer quins són els nivells de tolerància admissibles per a la salut humana.

Per aquesta raó, països com la Unió Europea, els Estats Units, Canadà o Japó han establert uns criteris bàsics que permeten fixar el límit de tolerància d'una molècula en cadascun dels teixits consumibles.

Per conèixer quin és el nivell de fàrmac, metabòlit o producte de degradació (residu marcador) que no té efectes tòxics observables, es necessari realitzar una sèrie d'estudis que permetin definir el perfil toxicològic d'aquest. Entre ells, hi ha estudis de teratogenicitat, mutagènesi, carcinogènesi, immunotoxicitat, neurotoxicitat, estudis de resistències. Així el NOEL correspondrà a la dosi més baixa que, en tots els estudis realitzats, no hagi donat lloc a cap reacció adversa. S'escull el valor inferior obtingut en l'espècie i en el test més sensible (EMEA/V/KG/kg/38896/99, 2000).

En conclusió, aquest valor pot referir-se a la toxicitat, al nivell de resistències -si es tracta d'un antimicrobià- o a les seves propietats farmacològiques, i sempre és el valor més baix de tots.

A partir del NOEL es fixa la ingesta diària acceptable (IDA), que és una estimació de la quantitat d'una determinada substància expressada en referència al pes corporal que podria ser ingerida per una persona diàriament, durant tota la seva vida, sense cap risc per a la seva salut.

Un cop es té el valor d'IDA s'estableix el límit màxim de residus (LMR), que és la concentració màxima de residu que es pot acceptar en un aliment,

després d'administrar un medicament veterinari en animals destinats al consum humà, expressat en mg/kg de pes fresc (Reglament (CE). 2377/90, 1990).

Per fixar aquest limit es parteix del valor d'ingesta diària acceptable i dels aliments que una persona pot consumir diàriament, amb l'objectiu d'estimar la quantitat de substància/residu marcador que podrà estar present en cada teixit, objecte de consum, per una persona.

$$\text{Concentració segura} = \text{IDA (x 60 kg)/factor consum d'aliments}$$

El factor de consum d'aliments està basat en la mitjana de la ingesta que realitza un individu dels diferents tipus d'aliments. Aquest valor s'ha fixat d'acord amb els hàbits alimentaris dels diferents països. Per poder fer la distribució del consum d'aliments es necessari conèixer la distribució del fàrmac i/o metabòlits en l'organisme de l'espècie de destí. Per això, és necessari realitzar estudis en els quals s'avaluï el perfil cinètic plasmàtic i tissular de la molècula objecte d'estudi.

Per conèixer quins són els teixits diana on el residu marcador està present en concentracions amb risc per a la salut del consumidor, s'han de realitzar estudis de depleció de residus en els quals, per fer un seguiment més acurat, s'utilitzen molècules marcades radioactivament (C^{14}) de manera que la traçabilitat d'aquestes sigui completa.

S'ha de destacar que en la distribució de les quantitats de fàrmac tolerables en cada teixit diana hi ha la possibilitat que el fàrmac pugui arribar a l'home per altres vies diferents de la de la carn, per exemple perquè s'hagi

administrat en vaques productores de llet o en gallines ponedores. Per tant, s'haurà de distribuir la IDA entre els diferents teixits consumibles (carn, llet, ous i mel) per fixar l'LMR en cada teixit.

L'Unió Europea ha confeccionat unes llistes (Anexos I, II, III, IV) en què es classifiquen les diferents substàncies actives que podran ser utilitzades en els animals productors d'aliments, un cop establert l'LMR per a cada teixit (EMEA/MRL/829/02-FINAL, 2002).

— Annex I: llista de substàncies farmacològicament actives per a les quals s'ha establert un límit màxim de residus.

— Annex II: llista de substàncies no subjectes a un límit màxim de residus. Es tracta de substàncies utilitzades en medicina veterinària per a les quals no cal fixar un límit màxim de residus per a la protecció de la salut pública, perquè s'eliminen molt ràpidament, perquè són substàncies endògenes, perquè no s'absorbeixen o perquè no s'ha identificat cap risc per a la salut del consumidor.

— Annex III: llista de substàncies farmacològicament actives utilitzades en els medicaments veterinaris per a les quals s'han establert límits màxims provisionals.

— Annex IV: llista de substàncies farmacològicament actives per a les quals no es pot establir cap límit màxim de residus, ja que es tracta de substàncies que constitueixen un risc per a la salut del consumidor. Per aquesta raó, queda prohibit administrar substàncies d'aquest annex a animals productors d'aliments.

INTRODUCCIÓ

Aquest LMR es tindrà en compte per fixar el temps d'espera de cada especialitat farmacèutica, que és l'interval de temps des de l'última administració del medicament en l'espècie de destí, en condicions normals d'ús, fins que en els teixits destinats al consum humà el residu marcador arriba a nivells iguals o inferiors a l'LMR fixat.

Aquest període serà resultat de la cinètica del fàrmac, és a dir, un fàrmac que s'elimini ràpidament tindrà una semivida biològica curta i per tan, un temps d'espera reduït. Però cal tenir en compte, que factors com la via d'administració, la forma farmacèutica i el règim de dosificació, poden modificar l'absorció, la distribució i/o l'eliminació del fàrmac, i per tant, donar una pauta de depleció de residus diferent i, en conseqüència, uns temps d'espera també diferents.

Per a la determinació del temps d'espera, s'han de realitzar estudis en els quals es determinaran els residus presents en cadascun dels teixits diana, en diferents temps de sacrifici, després de l'administració del medicament per la via adequada i en la pauta terapèutica fixada.

Les corbes obtingudes per a cada teixit proporcionaran un temps d'espera, igual o diferent, per a cadascun d'ells, i es prendrà com a vàlid, per al medicament administrat, el teixit que ha presentat un valor superior.

La tilosina, fàrmac objecte d'aquest estudi, és un dels fàrmacs que es troba inclòs en l'Annex I. Els seus LMR són de 100 µg/kg per a tots els teixits en les diferents espècies productores d'aliments, excepte per a la llet i els ous que són de 50 i 200 µg/kg, respectivament (taula1).

Taula 1. LMR de la tilosina en els diferents teixits diana dels animals per als quals se'n recomana l'administració (EMEA/MRL/732/00-FINAL, 2000).

Fàrmac	Residu marcador	Espècie animal	LMR	Teixits diana
Tilosina	Tilosina A	Bovins	100 µg/kg	Múscul
			100 µg/kg	Greix
			100 µg/kg	Fetge
			100 µg/kg	Ronyó
			50 µg/kg	Llet
		Porcins	100 µg/kg	Múscul
			100 µg/kg	Pell+greix
			100 µg/kg	Fetge
			100 µg/kg	Ronyó
		Aus	100 µg/kg	Múscul
			100 µg/kg	Pell+greix
			100 µg/kg	Fetge
			100 µg/kg	Ronyó
			200 µg/kg	Ous

Aquests estudis per a avaluar el temps d'espera, com ja s'ha indicat anteriorment, estan clarament fonamentats en el perfil cinètic del fàrmac, o sigui, en els processos d'absorció i distribució, el metabolisme i l'excreció, i és per això que és necessari avaluar-ne la cinètica plasmàtica que donarà informació relativa a:

1. La rapidesa d'absorció des del lloc d'administració.
2. La capacitat de sortir del torrent circulatori i arribar als teixits o emmagatzemar-s'hi.
3. La velocitat d'eliminació mitjançant el metabolisme i l'excreció.

És així que, quan el fàrmac és administrat per una via diferent de la intravenosa, s'han de tenir en compte diferents factors que en condicionaran la biodisponibilitat.

En el procés d'absorció, els fàrmacs han de travessar les membranes fins arribar a la sang. Aquests processos poden ésser de diferents tipus, la majoria de fàrmacs són absorbits per transport passiu, és a dir, per dissolució en el component lipídic de la membrana cel·lular o per filtració a través dels porus transmembrana; però també hi ha fàrmacs que utilitzen transport mediat per components de membrana (proteïnes transportadores) com és el cas de la difusió facilitada i del transport actiu, amb la diferència que aquest últim necessita consum d'energia, doncs és produeix a contragradient. Altres formes d'absorció comprenen la vesiculació, la pinocitosi o la fagocitosi (Baggot, 1988).

En el cas del transport passiu, una sèrie de factors intervenen modulant la velocitat del pas del fàrmac a través de les membranes. En primer lloc, les característiques fisicoquímiques de la molècula i del medi on són administrats. Així, el pes molecular, la forma molecular, el seu pKa, la seva acidesa o basicitat, la solubilitat en els fluids orgànics on són administrats, el pH del medi, la presència de proteïnes, greixos, metalls quelants, etc. En segon lloc, el flux sanguini que irriga la zona on es produeix l'absorció.

Quan el fàrmac arriba a la sang, moltes molècules d'aquest poden unir-se a les proteïnes plasmàtiques i a les macromolècules circulants i d'aquesta manera no pot difondre lliurement fora del plasma. Com a norma general, la part de fàrmac que arriba al lloc d'acció és una part molt petita del present a l'organisme; la resta del fàrmac roman en solució en els diferents

compartiments de l'organisme o es localitza en partícules subcel·lulars o en dipòsits adiposos.

Així la distribució d'un fàrmac en els teixits dependrà en major o menor grau de les característiques fisicoquímiques, dels paràmetres sanguinis (pH, proteïnes plasmàtiques, etc.) i del medi que el reb: els teixits, on aquest quedarà més o menys retingut segons la seva afinitat envers els per els diferents components tissulars. Els fàrmacs que s'acumulen en un determinat teixit poden actuar com a reservori i allargar la permanència del fàrmac en l'organisme i, consegüentment, la seva acció.

Un cop els fàrmacs s'han distribuït pels teixits, aquests poden ser metabolitzats i/o excretats per diferents òrgans. Les reaccions de biotransformació són portades a terme pel sistema microsomal, les mitocondries, els enzims solubles, els lisosomes o per la microflora existents en òrgans com el budell, el fetge, el ronyó o bé en la sang i el sistema nerviós central. Alguns fàrmacs són metabolitzats en el plasma per diferents esterases, però el principal òrgan transformador i detoxificador és el fetge, que mitjançant reaccions enzimàtiques, s'encarrega d'eliminar els fàrmacs de l'organisme, generalment, en forma de compostos més polars.

Finalment, els fàrmacs i els seus metabòlits són eliminats de l'organisme, excretats al medi exterior per diferents vies com la renal (orina), la biliar, la intestinal (femtes), la pulmonar, la salival, la gàstrica, la cutània, la llagrimal o la mamària (Velasco, 2003). El ronyó acostuma a ser l'òrgan excretor per excel·lència, encara que, segons les característiques del fàrmac poden haver-hi altres vies d'excreció predominants, com per exemple, en el cas de

l'administració d'un anestèsic volàtil en què el pulmó serà l'òrgan predominant d'excreció.

L'objectiu de l'ús dels fàrmacs és lògicament el tractament preventiu o curatiu d'una malaltia, i és per això que els estudis cinètics estan sempre fonamentats en una dosi i una posologia capaces de resoldre el quadre clínic del pacient.

En el cas que s'hagi d'utilitzar un antibacterià, s'haurà de tenir en compte que la resposta d'un pacient envers el tractament amb antibacterians és molt variable, cosa que dificulta el disseny d'un règim de dosificació que optimitzi aquest tractament farmacològic i en garanteixi la màxima eficàcia (Sánchez, 2000).

Entre els factors que determinen l'èxit o el fracàs d'un tractament hi ha l'activitat antibacteriana, el perfil farmacocinètic del fàrmac, la presència o absència d'un possible "efecte postantibiòtic", i la resposta immune del pacient.

La consideració d'aquests factors porten, en la pràctica clínica (humana), al tractament individualitzat mitjançant l'ús d'uns paràmetres anomenats índexs d'eficàcia (Schentag i cols., 1992). Aquests índexs, basats en paràmetres microbiològics i farmacocinètics, proporcionen informació sobre l'eficàcia potencial d'un determinat tractament.

L'objectiu del tractament individualitzat és el disseny d'una dosificació que assoleixi les concentracions plasmàtiques més efectives. Aquestes concentracions són determinades per les característiques del pacient i del

tipus de microorganisme responsable de la infecció. Amb els antibiòtics, la resposta al tractament depèn d'una interacció pacient-fàrmac-bacteri, per la qual cosa s'ha de tenir en compte la variabilitat farmacodinàmica del fàrmac junt amb la variabilitat farmacocinètica.

De la combinació d'aquests conceptes, sorgeix l'anomenada anàlisi farmacocinètica-farmacodinàmica (PK-PD) que té com a finalitat, escollir una estratègia d'administració adequada amb una dosi òptima, per aconseguir una màxima eficàcia i alhora, minimitzar el desenvolupament de resistències.

Per a avaluar aquestes relacions és imprescindible conèixer l'activitat de l'antibacterià davant els diferents patògens, és a dir, la sensibilitat del bacteri respecte a l'antibacterià.

Hi ha diferents paràmetres per a establir el grau de sensibilitat dels bacteris patògens envers els diferents antibacterians, així:

- *Concentració mínima inhibidòria (CMI)*: és la concentració més baixa de l'antibiòtic que evita el creixement dels microorganismes després de 18-24 hores d'incubació amb un inòcul de microorganismes de 10^4 a 10^5 UFC (Reese i Douglas, 1987). És una mesura bacteriostàtica que es refereix a la inhibició del desenvolupament bacterià i s'expressa com a concentració (μg , UI, $\mu\text{mol/ml}$). Depenent del grau d'inhibició del creixement bacterià s'obté la CMI₅₀, CMI₇₅, CMI₉₀ o CMI₁₀₀, segons si la inhibició és del 50, 75, 90 o 100 % (Dámaso, 1990).

- *Concentració mínima bactericida (CMB)*: és la concentració més baixa d'antibiòtic que causa la mort total del bacteri o que permet la supervivència de <0.1 % de l'inòcul inicial (Reese i Douglas, 1987). Els antibiòtics bactericides tenen valors similars de CMI i de CMB com en el cas dels β -lactàmics o de les fluoroquinolones (Chow i cols., 1985). La resistència a un antibiòtic pot aparèixer quan l'agent és un bactericida i un patogen és inhibit en comptes de ser destruït.

Cada antibiòtic té un valor crític de CMI o CMB que permet classificar les soques com a susceptibles o resistents sobre la base de si el valor obtingut és major o menor que el valor crític. Aquest valor és difícil de determinar i es calcula sobre la base de l'eficàcia de l'antibiòtic en processos causats pel patogen en qüestió. A més a més, la resposta del pacient depèn de diferents factors i això dificulta la determinació d'aquest valor crític.

Una altra limitació inherent a l'ús d'aquests dos paràmetres com a indicadors del potencial d'un determinat tractament antibacterià és que aquestes determinacions es fan sota condicions experimentals amb inòculs menors als implicats en una infecció real i amb microorganismes en fase de ràpid creixement, mentre que en condicions *in vivo* les condicions són diferents.

- *Relació bactericida*: aquesta relació es calcula a partir de la corba que relaciona el nombre de bacteris supervivents respecte al temps. Hi ha dos tipus de cinètiques bactericides, la cinètica concentraciódependent, en què hi ha un augment de la taxa bactericida quan augmenta la concentració antibiòtica, i la

concentració independent, en què la taxa es manté constant per sobre d'un valor llindar, independentment de la concentració antibiòtica.

- *Efecte postantibiòtic (EPA)*: és la persistència de la inhibició del creixement bacterià després de l'exposició del bacteri a l'antibiòtic quan aquest ja no és detectable (Spivey, 1992). Aquest efecte s'observa en tots els antibiòtics, encara que no tots provoquen aquest efecte en tots els microorganismes. Els antibiòtics que inhibeixen la síntesi de proteïnes, DNA i RNA (aminoglicòsids, macròlids, fluoroquinolones, metronidazole, cloramfenicol, rifampicina i trimetoprim, etc.) presenten un efecte postantibiòtic envers la majoria de bacteris. Els agents antimicrobians que inhibeixen la síntesi de la paret cel·lular (β -lactàmics, glicopèptids) provoquen un moderat efecte postantibiòtic en els estafilococs, un baix efecte postantibiòtic en els estreptococs i un mínim efecte postantibiòtic en els bacteris gramnegatius.

La durada d'aquest efecte varia d'un fàrmac a l'altre i depèn de la soca de microorganisme. L'efecte postantibiòtic no es pot predir amb la CMI o CMB i s'ha de determinar en cada cas per models *in vivo* i *in vitro*.

Estudis *in vivo* han mostrat que la presència de leucòcits millora i perllonga l'EPA (Spivey, 1992), factor que cal tenir en compte en pacients neutropènics.

Com ja s'ha esmentat abans, el perfil cinètic té un paper decisiu en la resposta final davant d'un tractament, perquè d'ell depèn la concentració de

fàrmac en el lloc de la infecció. Per aquesta raó es considera que alguns paràmetres farmacocinètics donen informació per a conèixer la intensitat del contacte antibiòtic-bacteri. Per a valorar quantitativament l'eficàcia dels tractaments amb els diferents fàrmacs, han sorgit diferents índexs de la relació entre alguns paràmetres microbiològics i de certs paràmetres farmacocinètics; aquests índexs permeten fixar una pauta posològica més adequada. Entre els més importants destaquen:

- AUC_{0-24h}/CMI : relació de l'àrea sota la corba concentració-temps i la concentració mínima inhibidora.
- C_{max}/CMI : relació de la concentració plasmàtica màxima i la concentració mínima inhibidora.
- $T>CMI$: interval posològic durant el qual els nivells són superiors al valor de CMI.

D'acord amb el tipus d'antibiòtic, hi ha paràmetres que indiquen millor l'eficàcia que d'altres. Així, per als antibiòtics concentraciódependents ho són els paràmetres: C_{max}/CMI i AUC_{0-24h}/CMI ; en canvi, per als antibiòtics tempsdependents ho és el $T>CMI$.

En el cas dels macròlids i segons el tipus de que es tracti, varia el paràmetre escollit per a determinar-ne l'eficàcia encara que, en general, són fàrmacs que tenen una cinètica en sang molt diferent de la cinètica en teixits (Rodvold i Piscitelli, 1993). Per a la tilosina no hi ha dades descrites sobre estudis d'eficàcia ja que es tracta d'un antibiòtic d'ús exclusivament veterinari.

1.1. ANTIBIÒTICS MACRÒLIDS. GENERALITATS

1.1.1. Evolució històrica

Aquest grup d'antibiòtics va ser descobert el 1952 quan McGuire i cols. aïllaren l'eritromicina en cultius d'una soca d'*Streptomyces erythreus*, obtinguda a partir d'una mostra de sòl d'una illa de les Filipines. A la vegada, es van realitzar les primeres observacions *in vitro*, se'n mesuraren els límits de toxicitat i es demostrà l'eficàcia d'aquest antibiòtic en infeccions experimentals i naturals causades per cocs grampositius. Durant les dècades següents es varen anar aïllant antibiòtics amb una estructura anàloga a l'eritromicina, com l'espíramicina el 1952, la kitasamicina (leucomicina) el 1953, l'oleandomicina el 1956 i el seu èster triacetat (troleandomicina) al 1957, la tilosina i la carbomicina al 1960, la josamicina al 1967, la rosamicina i la midecamicina el 1971 (Barrigón i cols., 1993).

Al final dels anys 70, es van començar a sintetitzar derivats i anàlegs de l'eritromicina per millorar les propietats químiques, microbiològiques i farmacocinètiques d'aquests. Així, per millorar els problemes en la biodisponibilitat oral de l'eritromicina i d'altres antibiòtics macròlids naturals es van generar molècules com la rokitamicina (propionil-leucomicina A5) i la miocamicina (acetil-midecamicina) mitjançant l'esterificació o la formació de sals de compostos derivats de fermentacions (Mazzei i cols., 1993). També van aparèixer derivats semisintètics com la claritromicina (6-O-metileritromicina), la roxitromicina (9-O-[(2-metoxietoxi)metil]oxina eritromicina) i l'A-62671 (principal metabòlit de la claritromicina en humans el 1981, així com l'azitromicina (deoxo-azametilhomo-eritromicina) el 1982, la fluritromicina (8-fluoro-eritromicina), i la diritromicina (9-deoxo-11-deoxi-9,11-imino-2-metoxietoxi etilidene-oxi-

eritromicina), que és a l'hora un profàrmac de l'eritromicilamina (Barrigón i cols., 1993).

L'eritromicina, l'espíramicina, la tilosina i la tilmicosina han trobat la màxima aplicació clínica dins la medicina veterinària. Altres macròlids com l'oleandomicina i la carbomicina, juntament amb la tilosina han estat utilitzats com a additius alimentaris per a la promoció del creixement en l'alimentació animal (Spoo i Riviere, 1995).

Altres molècules més noves com l'A-66005, l'A-66173 i l'ER42859 han aconseguit inhibir bacteris resistents a l'eritromicina (Kirst, 1991).

La tendència actual en la investigació farmacèutica és la de descobrir noves molècules amb la finalitat de millorar la farmacocinètica, l'espectre d'acció i vèncer les resistències bacterianes.

1.1.2. Característiques fisicoquímiques. Classificació

Els antibiòtics macròlids són compostos de naturalesa bàsica, poc hidrosolubles que presenten un anell lactònic macrocíclic al qual tenen acoblat un desoxisucres i/o un aminosucres o diversos. L'estructura lactònica pot estar constituïda per un nombre variable d'àtoms de carboni (12-20) que s'uneixen als sucres mitjançant enllaços glicosídics.

Aquest anell lactònic pot estar substituït per grups hidroxil o alquil, o bé per una cetona al C7 en el cas dels macròlids de 12 àtoms, al C9 en els macròlids de 14 àtoms o per un grup aldehid en els compostos de 16 àtoms. L'únic compost amb 15 àtoms, l'azitromicina, conté un grup amino terciari.

Els grups hidroxil de l'anell lactònic poden ser substituïts per 1, 2 o 3 sucres neutres o bàsics, que donen a la molècula un caràcter més o menys bàsic. Estudis sobre la correlació entre l'estructura dels macròlids i la seva activitat han demostrat que els compostos més bàsics eren a l'hora els més actius (Bryskier i cols., 1986).

Figura 1. Estructura química dels principals macròlids de 14, 15 i 16 àtoms de carboni (Hardy i cols., 1988).

Tots els macròlids són bases dèbils amb un pK_a amb un rang entre 6-9, la qual cosa els hi permet passar fàcilment cap als teixits per difusió passiva. Són inestables en medi àcid encara que derivats semisintètics com l'azitromicina i la roxitromicina es caracteritzen per una major estabilitat en aquest medi.

Des d'un punt de vista químic, els macròlids més comunament usats i més efectius poden dividir-se en tres grups d'acord amb el nombre d'elements que constitueixen l'anell macrocíclic (Barrigón i cols., 1993; Mediavilla, 1997):

- *Anell lactònic de 14 àtoms i dos sucres situats en posició 3 i 5:* eritromicina (A, B, C, D, E i F), eritromicilamina, oleandomicina, roxitromicina, claritromicina, diritromicina, fluritromicina, troleandomicina, albociclina, megalomicina, lancamicina, TE-031/A-56268, A-62671, A-66005, A-66173 i A-69334, EM-523 i ER-42859.
- *Anell lactònic de 15 àtoms:* azitromicina.
- *Anell de 16 àtoms:* tilosina, rosaramicina, miocamicina, midecamicina, carbomicina, leuomicina, espiramicina, josamicina, tilmicosina, diacetilmidecamicina, nidamicina, kitasamicina, rokitamicina, relomicina i angolamicina.

1.1.3. Activitat antimicrobiana

Malgrat les diferències en l'estructura química dels diferents components del grup, els macròlids constitueixen una classe d'antibiòtics molt homogènia quant a l'espectre d'acció, el mecanisme d'acció i les resistències.

Els macròlids posseeixen una potent activitat antibacteriana sobre la majoria de cocs grampositius, bacteris anaerobis i alguns bacils grampositius. Actualment, es consideren resistents la majoria dels bacils gramnegatius, malgrat això, són molt efectius davant *Bordetella pertussis*, *Bordetella burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii* i *Legionella pneumophila*, i bastant actius davant de *Neisseria meningitidis* i *gonorrhoeae*, *Pasteurella multocida* i *Clostridium perfringens*.

La gran sensibilitat dels estreptococs (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus agalactiae*) davant d'aquest grup d'antibiòtics en justifica l'ús com a fàrmacs de primera elecció en infeccions causades per aquests bacteris (Barrigón i cols., 1993). Tanmateix, han anat augmentant les resistències d'aquests bacteris al llarg del temps, i s'han presentat resistències creuades entre els diferents macròlids (Azaña i cols., 1998).

També són molt efectius contra bacteris com *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Moraxella catarrhalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Treponema pallidum* i alguns micobacteris atípics.

L'activitat dels macròlids davant el complex *Mycobacterium avium* (MAC) és més elevada que sobre *M. tuberculosis*, la claritromicina és l'antibiòtic més potent contra aquests bacteris i també envers *M. leprae*, *M. Chelonae* i *M. marinum* (Almirante, 1994).

La majoria d'aquests antibiòtics són actius davant de *Gardenerella vaginalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*,

Haemophilus influenzae, *Haemophilus parainfluenzae*, *Mobiluncus* spp. i *Propionibacterium acnes* (Azanza i cols., 1998).

Alguns macròlids són actius davant de paràsits com *Cryptosporidium* spp. i *Plasmodium* spp. Els macròlids no posseeixen en canvi, cap acció contra virus, llevats i fongs.

La importància d'aquest grup de fàrmacs, ha augmentat en els últims anys, a causa de la freqüència d'infeccions produïdes per bacteris que s'han fet resistents a altres antibiòtics (*Legionella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* i *Campylobacter*).

Pel que fa al seu ús en medicina veterinària, els macròlids han estat considerats com a antibiòtics de segona elecció contra bacteris grampositius; en canvi, per a malalties com la pneumònia o la mastitis són de gran valor per la seva capacitat per assolir altes concentracions en els teixits sensibles a la infecció (Gingerich i cols., 1977; Ziv i cols., 1995).

Si classifiquèssim els bacteris d'acord amb la sensibilitat que presenten envers els diferents tipus de macròlids, es podrien obtenir quatre grups (Williams i Sefton, 1993):

1. Bacteris piogènics de creixement ràpid: estafilococs, estreptococs, enterococs, gonococs i cocs anaerobis. Són bacteris susceptibles als fàrmacs β -lactàmics i a l'eritromicina. La gran majoria dels macròlids són força actius envers aquests bacteris.

2. Bacteris resistents als β -lactàmics i a l'eritromicina: enterobacteris, pseudomones i *Haemophilus influenzae*. Cal destacar l'activitat de l'azitromicina sobre aquests bacteris.

3. Bacteris per als quals està especialment indicat l'ús d'antibiòtics com l'eritromicina i les tetraciclines: *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma pneumoniae* i *Bacteroides* spp.

4. Organismes envers els quals aquesta antibioteràpia és limitada: *P. carinii*, *T. gondii* i micobacteris atípics.

1.1.4. Mecanisme d'acció

L'efecte antibacterià dels antibiòtics macròlids es deu a la seva capacitat d'inhibir la síntesi proteica per la qual cosa se'ls defineix com a compostos bacteriostàtics. Aquesta síntesi té lloc gràcies a la traducció de la informació genètica codificada a l'ARNm. La síntesi té lloc en els ribosomes en tres etapes: iniciació, elongació que comprèn alhora tres fases: reconeixement, transferència i translocació i terminació.

El ribosoma 70S, que com se sap, està compost per dues subunitats 30S i 50S, és la unitat funcional de la síntesi proteica en els bacteris. La inhibició de la síntesi es produeix mitjançant la unió reversible del fàrmac a les proteïnes ribosòmiques L22 i L27 de la subunitat 50 S una vegada aquest ha penetrat en el citoplasma bacterià per difusió passiva. En el cas dels macròlids de 14 àtoms de carboni l'ocupació de la proteïna L22 impedeix el fenomen de translocació, és a dir, el pas d'una molècula de peptidil RNAt del lloc acceptor al lloc donador, i per tant, la progressió del següent codó

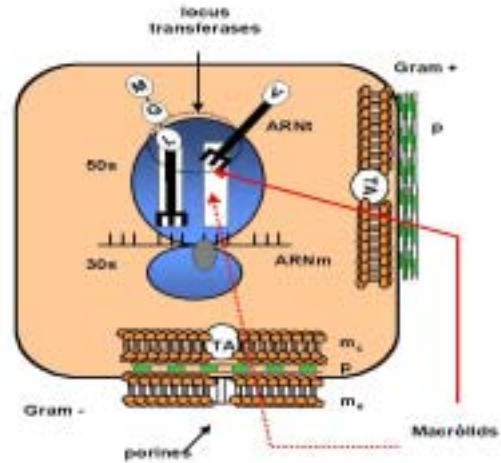
de l'RNAm (Brisson-Noël i cols., 1988). En canvi, els de 16 àtoms de carboni s'uneixen a la proteïna L27, i inhibeixen així la formació de l'enllaç peptídic previ al procés de translocació.

Els macròlids en general no s'uneixen als ribosomes dels mamífers, sinó que ho fan només als dels organismes procariotes. Efectivament poden unir-se als ribosomes mitocondrials dels mamífers però no poden travessar la membrana de la mitocòndria, i la qual cosa evita la depleció de la medul·la òssia (Spoo i Riviere, 1995).

Hi ha diferents factors dels quals depèn que un antibiòtic es comporti com a bacteriostàtic o com a bactericida com ara l'espècie bacteriana, la concentració en el lloc de la infecció, l'estat de creixement bacterià i el pH del medi (Brittain, 1987). Així, en un pH bàsic els macròlids es troben en forma no ionitzada i, per tant, poden travessar millor la paret bacteriana, i augmentar la seva acció antibacteriana. També els bacteris grampositius mostren menys resistència al pas d'aquests fàrmacs a través de la seva membrana, així com els bacteris que tenen una paret cel·lular deficient com les *Chlamydias*, les *Rickettsias* i els *Mycoplasmas* (Barrigón i cols., 1993).

S'ha de tenir en compte que els macròlids requereixen de 2-4 vegades la concentració mínima inhibidora (CMI) per arribar a la concentració mínima bactericida (CMB) i que aquesta concentració s'ha de mantenir durant un temps suficient per ser efectiva. En concentracions subinhibitòries (efecte postantibiòtic), l'efecte antibacterià es manté durant un període de temps diferent per a cada macròlid (Mediavilla, 1997).

Figura 2. Mecanisme d'acció dels macròlids: inhibició de la síntesi proteica del bacteri.



1.1.5 Resistències

Les resistències als macròlids poden ser causades per alteracions ribosòmiques, mutacions cromosòmiques i transferències de plasmidis.

Les alteracions ribosòmiques són rares i el mecanisme de resistència més freqüent consisteix en una modificació posttranscripcional de l'RNA de la subunitat 23 S del ribosoma per una monometilació o dimetilació del residu d'adenina.

També la resistència pot ésser deguda a mutacions cromosòmiques ràpides i sovint inestables que alteren la proteïna ribosòmica 50 S, i que impedeixen la unió de l'antibiòtic al ribosoma.

Els mecanismes de resistència coneguts, mitjançant plasmidis, poden ser resultat de 3 tipus de modificacions:

- disminució de la penetració del fàrmac a través de la membrana cel·lular, sobretot en bacteris gramnegatius (enterobacteris) (Lampson i cols., 1986);
- producció d'un enzim metilasa que modifica el lloc de fixació de la subunitat 50S del ribosoma, i disminueix la capacitat d'unió del fàrmac (Leclercq i cols., 1988);
- hidròlisi dels macròlids per acció d'esterases produïdes per Enterobacteriaceae (Barthelemy i cols., 1984).

També s'ha descrit com a mecanisme de resistència, l'existència en la membrana bacteriana d'un sistema que funciona com una bomba i que retorna a l'exterior els macròlids amb anells de 14 i 15 àtoms de carboni que han entrat a la cèl·lula bacteriana (Goldman i Capobianco, 1990).

L'aparició de resistències és habitualment creuada entre tots els membres del grup i freqüentment amb lincosamides i cloramfenicol, però en algunes espècies bacterianes la resistència creuada succeeix només entre components del mateix grup de macròlids. (Mediavilla, 1997).

1.1.6. Indicacions terapèutiques

Els antibiòtics macròlids estan indicats en el tractament d'infeccions respiratòries (de les vies respiratòries altes, com la faringitis, l'otitis mitjana i la sinusitis, i de vies respiratòries baixes, com la bronquitis, la pneumònia o l'exacerbació de l'EPOC), gastrointestinals (gastritis i ulcus pèptic, diarrea bacteriana), genitourinàries (uretritis, cervicitis i la malaltia pèlvica inflamatòria), de pell i teixits tous (erisipela, cel·lulitis, linfangitis, impetigen i acne) i per al tractament de l'endocarditis i de malalties parasitàries com la criptosporidiosi i la toxoplasmosi.

Actualment, s'està considerant la utilització dels macròlids en el tractament de l'arteriosclerosi i de l'asma, ambdues malalties relacionades amb el possible paper de *Chlamydia pneumoniae* (Azanza i cols., 1988).

Els macròlids són especialment útils en casos d'al·lèrgia als antibiòtics β -lactàmics o quan les tetraciclins estan contraindicades.

1.1.7. Reaccions adverses

Aquest grup d'antibiòtics es caracteritza per la seva escassa toxicitat i per la seguretat en el seu ús terapèutic. Malgrat això, tots tenen en comú la seva naturalesa irritant.

Les reaccions adverses descrites en la bibliografia fan referència sobretot als humans i es poden resumir en: epigastràlgies, nàusees, vòmits, i/o diarrea sobretot en les formes orals, a causa d'un efecte del fàrmac sobre la motilitat gastrointestinal més accentuat en els derivats que tenen un anell de 14 àtoms i menor en els macròlids de nova generació. Menys freqüents són les reaccions al·lèrgiques menors amb manifestacions dèrmiques, febre medicamentosa i eosinofília, la sordesa transitòria que apareix en dosificacions altes i l'augment de transaminases. També poden causar hepatitis colestatàtica amb quadre de nàusees, vòmits, dolor abdominal, icterícia i febre, acompanyada de leucocitosi, eosinofília i augment de l'aspartat aminotransferasa sèrica.

Administrats per via i.v. els macròlids provoquen l'aparició de tromboflebitis, especialment si la injecció es fa de manera ràpida o en dosis elevades.

Per via i.m. o de manera subcutània provoca un dolor local molt intens i alhora una reacció inflamatòria que, si es perllonga, acaba produint l'encapsulament del fàrmac i la necrosi del teixit del voltant.

En els animals, l'ús dels macròlids ha produït nàusees, vòmits i rarament, erupcions cutànies. Es considera tòxica la seva administració per via oral a herbívors (Prescott, 2000). En cavalls, ha estat descrita la diarrea severa després de l'administració oral de l'eritromicina (Spoo i Riviere, 1995; Mediavilla, 1997).

1.1.8. Característiques farmacocinètiques

Els macròlids es caracteritzen per ser antibiòtics amb estructura química, espectre antibacterià, mecanisme d'acció i resistència similars, però amb diferents propietats farmacocinètiques.

La farmacocinètica d'aquests antibiòtics es descriu normalment d'acord amb un model bicompartimental en què la concentració en els teixits (compartiment perifèric) és molt superior a les concentracions plasmàtiques (compartiment central) (Van Duyn i Folkerts, 1979).

Els macròlids són antibiòtics molt liposolubles i, com a conseqüència, la seva distribució tissular és elevada, i pot arribar a concentracions altes gairebé en tots els líquids i teixits corporals, especialment, a les secrecions bronquials, el teixit prostàtic, els exsudats de l'oïda mig i teixit ossi, tal com demostren les relacions de concentració teixit/plasma, que en general són més grans que 1 (Periti i cols, 1989). Poden travessar la placenta i arribar en poca quantitat al líquid sinovial, però no poden superar la barrera

hematoencefàlica en condicions normals, llevat del cas de meningitis. També es troben en concentracions molt altes a l'interior de les cèl·lules, i poden arribar a superar la concentració plasmàtica en 10-100 vegades (Williams i Sefton, 1993). Les altes concentracions trobades en els lisosomes de cèl·lules fagocitàries (macròfags i leucòcits polimorfonuclears), els fa útils davant de gèrmens intracel·lulars com *Legionella* o *Chlamydia*, i també fa que augmenti la permanència del fàrmac en l'organisme.

El pas d'aquests antibiòtics des de la sang cap als teixits (amb un pH menor que la sang) es fa per difusió passiva.

La unió a proteïnes plasmàtiques es realitza majoritàriament sobre l' α -1-glicoproteïna àcida i varia entre un 93 % per la roxitromicina i un 15 % per a la josamicina i la midecamicina.

L'eliminació d'aquests fàrmacs es fa per metabolisme microsomal hepàtic mitjançant desmetilació a través del citocrom P-450 (isoenzim CYP3A4), excepció feta dels macròlids d'anells de 16 elements, que no es desmetilen. Els metabòlits fruit d'aquesta acció són inactius amb excepció dels de la claritromicina (14-hidroxiclaritromicina) i de la diritromicina (eritromicilamina). La semivida d'eliminació pot anar des de les 2 h per a l'eritromicina fins a les 12-14 h per a l'azitromicina (Barrigón i cols, 1993). Aquest augment en els temps de vida mitjana estan directament associats amb grans volums de distribució i també amb altes concentracions tissulars i sobretot amb altes concentracions intracel·lulars. Cal afegir, que els macròlids tenen la doble capacitat d'activar i inhibir els isoenzims de la

subfamília CYP3A del citocrom P450, la qual cosa n'augmenta l'efecte terapèutic (Babany i Pessayre, 1988).

L'excreció dels macròlids té lloc predominantment en el tracte biliar (femtes) (>60%) i també, en menor proporció, per l'orina (3-5%). La reabsorció intestinal i la circulació enterohepàtica fan de la biodisponibilitat un paràmetre difícil de calcular. Els percentatges excretats per orina o per bilis poden variar segons la forma d'administració, i són més grans els primers després de l'administració i.v. que després de l'administració oral. L'aclariment urinari acostuma a ser lent i variable però pot representar la via més important d'eliminació després de ser administrats parenteralment. La concentració de macròlids en llet és diverses vegades superior a la plasmàtica, especialment si hi ha mastitis.

Quan aquests fàrmacs s'administren per via oral, s'ha de tenir en compte que fàrmacs són molt inestables en medi àcid, per això la seva administració per aquesta via es fa en forma d'èsters (estearat, propionat, estolat, etilsuccinat) o en formes farmacèutiques amb envoltures gastroresistents excepte per a la roxitromicina, la claritromicina i l'azitromicina que no precisen aquestes transformacions. Com a bases dèbils que són la seva absorció es produeix en el medi alcalí del budell.

Els macròlids amb anells de 16 elements tenen una estabilitat més gran a pH baix, però la seva biodisponibilitat no és total. Els aliments interfereixen en l'absorció oral de l'eritromicina, la roxitromicina i la josamicina, però no en la miocamicina, la troleandomicina o l'espíramicina (Barrigón i cols., 1993). En canvi, l'administració conjunta de roxitromicina amb llet n'augmenta la biodisponibilitat en un 15 % (Periti i cols., 1989). El tipus de formulació de

cada macròlid també en pot influenciar l'absorció, i donar lloc a diferents percentatges de biodisponibilitat (Williams i Sefton, 1993).

L'administració i.m. i i.v. pot ser dolorosa en el cas de l'eritromicina per la qual cosa n'és preferible l'administració oral.

La màxima concentració plasmàtica en la majoria dels macròlids es produeix entre les 1.5 i les 3 h després de la seva administració per via oral i aquesta presenta valors inferiors quan s'administra azitromicina o diritromicina, a causa de la seva ràpida distribució tissular.

1.1.9. Interaccions farmacològiques

Els macròlids poden inhibir el metabolisme dels fàrmacs en el fetge mitjançant la inactivació dels enzims oxidatius microsomals, a causa de la formació de complexos i la inhibició del citocrom P450-3A4 (CYP3A4) en els hepatòcits i enteròcits dels animals i dels humans (Von-Rosenteil i Adam, 1995). La formació d'aquest complex es produeix gràcies a dos factors estructurals d'alguns macròlids que són: la presència d'un grup N-dimetilamina accessible i el caràcter hidrofòbic del fàrmac.

També poden interferir amb els microorganismes de la flora intestinal per la seva acció antibiòtica i alhora augmentar el buidat gàstric causat per un efecte imitador de la motilina.

D'acord amb el grau d'afinitat per al CYP3A4, els macròlids poden classificar-se en tres grups (Periti i cols., 1992):

- un primer grup format per macròlids amb anell lactònic de 14 àtoms de carboni amb una amina terciària unida a un sucre, com per exemple, la troleandomicina i l'eritromicina. Són capaces de formar nitrosoalcans i complexos citocrom P450-metabòlit inactius, disminuir el metabolisme i, per tant, potenciar l'efecte dels fàrmacs amb què interaccionen.
- un segon grup és el constituït per derivats semisintètics com la josamicina, la fluritromicina, la roxitromicina, la claritromicina, la miocamicina i la midecamicina, els quals formen complexos menys freqüentment i rarament produeixen interaccions farmacològiques.
- un tercer grup, format per l'espíramicina, la tilosina, la rokitamicina, la ricamicina, la diritromicina i l'azitromicina, que no forma nitrosoalcans, ni inactiva el citocrom P450 i es incapaç de modificar la farmacocinètica dels altres compostos.

Així, les interaccions més freqüents amb els antibiòtics macròlids es produeixen quan s'administren junt amb carbamazepina, ciclosporina, terfenadina, astemizol i teofil·lina. Interaccions rares o de poca importància clínica són les que es produeixen amb alfentanil, sufentanil, antiàcids i cimetidina, anticoagulants orals, bromocriptina, felodipina, glibenclamida, levodopa/carbidopa, lovastatina, metilprednisolona, fenazona, fenitoïna, rifabutina i rifampicina, triazolam i midazolam, àcid valproic i zidovudina.

La combinació de diferents macròlids entre si, o de macròlids amb lincosamides o cloramfenicol tenen un efecte antagonista. La combinació amb la benzilpenicil·lina o rifampicina té efectes sinèrgics contra alguns microorganismes grampositius.

1.2. TILOSINA. GENERALITATS

1.2.1. Descobriment

La tilosina va ser descoberta el 1960 per McGuire i cols. (McGuire i cols., 1961) quan va ser aïllat l'actinomicet que la produïa (*Streptomyces fradiae*) en els laboratoris d'investigació de la societat farmacèutica Lilly, a partir d'una mostra de terra d'un arrossar de Tailàndia.

1.2.2. Característiques fisicoquímiques

La tilosina és un antibiòtic macròlid constituït per diferents substàncies, de les quals la tilosina A n'és el component majoritari (80 %) i el que té major activitat. Altres components minoritaris són la tilosina B o desmicosina, la tilosina C o macrocina, la tilosina D o relomicina, la lactenocina, la 5-oxi-micaminosiltilonolida i la desmicinosiltilosina (Kanfer i cols., 1998).

Cadascun dels components consisteix en un anell de lactona de 16 àtoms de carboni unit a tres desoxisucres (micinosa, micaminosa i micarosa) juntament amb altres radicals (Wilson, 1984). La fórmula molecular de la tilosina és $C_{46}H_{77}NO_{17}$ i el seu pes molecular és 916.14 g/mol. A la figura 3 es pot veure la fórmula estructural dels principals factors de la tilosina.

Figura 3. Estructura química de la tilosina i dels seus factors principals (Fish i Carr, 1986).

	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R3</u>
Tilosina A (tilosina)	-CHO	micarosil	micinosil
Tilosina B (desmicosina)	-CHO	-H	micinosil
Tilosina C (macrocina)	-CHO	micarosil	3-0-desmetilmicinosil
Tilosina D (relomicina)	-CH ₂ OH	micarosil	micinosil
DMT (desmicinosil tilosina)	-CHO	micarosil	-H

Té l'aparença d'una pols blanquinosa cristal·lina, poc soluble en aigua (5mg/ml a 25 °C), i la seva solubilitat està en raó inversa amb la temperatura. En canvi, és bastant soluble en alcohols, èsters, cetones, hidrocarburs clorats, benzè i èter; i insoluble en hidrocarburs no clorats.

El seu punt de fusió és 128-132 °C i la seva absorbància màxima en l'espectre lluminós és als 232 nm.

La tilosina pot donar lloc a sals solubles en aigua com el tartrat, el fosfat, el lactat, el bisulfat, el gluconat i l'hidroclorhidrat. També pot formar èsters. Les seves solucions aquoses són estables a pH 5.5-7.5 a temperatures de 25°C durant períodes de fins a 3 mesos, ja que per sota de pH 4.5 esdevé un altre compost també actiu, la desmicosina, i passa després a formar productes inerts (Fuentes, 1992).

Com tots els macròlids, es tracta d'una base dèbil amb un pKa de 7.1 (Prescott, 2000), per la qual cosa en condicions fisiològiques es troba poc dissociada.

La tilosina és considerada una molècula altament liposoluble.

1.2.3. Activitat antimicrobiana

La tilosina mostra una gran activitat davant de bacteris aerobis grampositius com *Bacillus* sp., *Corynebacterium* spp., *E. Rhusiopathiae*, *Listeria* spp., *Moraxella* spp., alguns estafilococs i estreptococs. També és molt activa davant aerobis gramnegatius com *Actinobacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Leptospira* spp., *Neisseria* spp., i envers bacteris anaerobis com *Bacteroides* spp., (excepte *B. Fragilis*), *Clostridium* spp., cocs anaerobis i *Mycoplasma* spp. (Prescott, 2000).

Moderadament susceptibles són alguns enterococs, algunes *Actinomyces* spp., i alguns *Fusobacterium* spp, *Haemophilus* spp., *Legionella* spp., *Ehrlichia* spp. i *Mycobacterium* spp. També és activa davant *Vibrio coli* i *Chlamidia*.

Són resistents a la tilosina les enterobacteriàcies, *Pasteurella*, *Pseudomona* spp., *Nocardia* spp., *Bordetella bronchiseptica* i *Brucella* spp.

Els valors de CMI són ≤ 0.7 $\mu\text{g/ml}$ per als bacteris susceptibles, entre 1 i $4\mu\text{g/ml}$ pels moderadament susceptibles i ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ per als bacteris resistents (Prescott, 2000).

A la taula 2 es poden veure les concentracions mínimes inhibidores de diferents microorganismes per a la tilosina (McGuire i cols., 1961; Prescott, 2000).

Taula 2. CMI de diferents microorganismes per a la tilosina.

Microorganisme	CMI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Aerobis grampositius		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.06	
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.4	
<i>Streptococcus</i> spp. (hemolític)	0.4	
<i>Streptococcus agalactiae</i>		1
<i>Streptococcus disgalactiae</i>		0.4
<i>Streptococcus suis</i>		12.5
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<0.1	<0.13
<i>Mycobacterium avium</i>		3.1
<i>Bacillus subtilis</i>	0.39	
<i>Corynebacterium</i> spp.	0.4	
<i>Listeria monocytogenes</i>		0.7

Microorganisme	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
Anaerobis grampositius		
<i>Clostridium</i> spp.	0.1	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2	
Aerobis gramnegatius		
<i>Pasteurella haemolytica</i>	32	128
<i>Pasteurella multocida</i> (bòvids)	64	128
(porcs)	13	13
<i>Pasteurella aeruginosa</i>		>100
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	200	>200
<i>Moraxella bovis</i>	0.4	>32
<i>Salmonella typhimurium</i>	>128	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>128	
<i>Escherichia coli</i>		>100
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.8	
<i>Brucella abortus</i>	100	
<i>Shigella hyodysenteriae</i>	>100	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	100	
<i>Haemophilus sommus</i>	6.25-12.5	8
Anaerobis gramnegatius		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1.56	4
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	3.12->100	
<i>Vibrio coli</i>	5	
<i>Lawsonia intracellularis</i>	64	
<i>Leptospira</i>	0.05	0.06

Microorganisme	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
Micoplasmes		
<i>Mycoplasma bovis</i>	0.097	0.5
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	0.05-0.1	
<i>Mycoplasma synoviae</i>	<0.09	
<i>Mycoplasma hyosinoviae</i>	0.097-100	16
<i>Mycoplasma mycoides</i>	0.03-0.06	0.06
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.19	1
<i>Mycoplasma hyorhinus</i>	0.097	1
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	0.06	0.32
<i>Ureaplasma</i>	0.08	0.13

1.2.4. Formes farmacèutiques d'administració

La tilosina es manufactura en tres formes diferents: tilosina base, tartrat de tilosina i fosfat de tilosina; que tenen la mateixa activitat. Es pot administrar per via oral, en forma de pols (sals solubles per barrejar en aigua o aliment) o per via intramuscular, subcutània o endovenosa en forma d'injectable, en una solució de propilenglicol i alcohol benzílic. També es pot administrar per via intranasal o per via intramamària.

1.2.5. Característiques farmacocinètiques

Després de la seva administració oral o parenteral i a causa de a les seves característiques altament liposolubles (Hamill i cols., 1961; Prescott, 2000) la tilosina es distribueix àmpliament per bastants teixits de l'organisme (fetge, ronyons, melsa, cor i pulmó) i líquids corporals (bilis, líquids

prostàtic, seminal, pleural o peritoneal). En alguns teixits i líquids extracel·lulars se n'han trobat concentracions superiors a la del plasma (pulmons i llet). No travessa la barrera hematoencefàlica, però sí que ho fa a nivell de la placenta. S'emmagatzema en els macròfags alveolars, cosa que augmenta la seva eficàcia contra microorganismes que causen patologia respiratòria (Chamberland, 2001, comunicació personal). S'uneix a les proteïnes plasmàtiques de manera moderada (40 %).

Pel que fa a la seva absorció, la tilosina és absorbida amb facilitat en el tracte digestiu de gallines i galls d'indi quan es presenta en forma de sal o tartrat de tilosina. En aus, el tartrat de tilosina es pot aplicar per via subcutània o també en l'aigua de beguda. En porcs, també s'utilitza el fosfat de tilosina, per via oral, però aquest s'absorbeix amb més dificultat que el tartrat de tilosina (Fuentes, 1992).

La biodisponibilitat oral de la tilosina en rates, gossos i vedells és baixa. Per aquesta via, i en la major part d'espècies, la C_{max} s'obté 1-2 h després de ser administrada (EMEA/MRL/205/97-FINAL, 1997).

Administrada per via i.m., s'ha vist que la tilosina s'absorbeix lentament des del múscul i s'elimina ràpidament des del plasma (Gingerich i cols., 1977). S'utilitza sobretot el fosfat de tilosina per la seva administració i.m..

La via més adient d'administració per aquest fàrmac és la intramuscular, després d'haver-la dissolt en propilenglicol i aigua i haver-hi afegit alcohol benzílic al 4 % com a bactericida. També es pot administrar per via intramamària.

La tilosina és metabolitzada i excretada pel fetge (bilis), també és eliminada en menor proporció pels ronyons (orina) i per la llet. Com a resultat del seu metabolisme hepàtic pot donar lloc a metabòlits actius, però el component majoritari tant en fetge com en ronyó és la tilosina A (residu marcador). Quan s'administra parenteralment, la seva eliminació pel fetge és més lenta, en canvi administrada parenteralment el teixit diana sembla ser el ronyó..

En vaques, en un estudi realitzat per Gingerich i cols., (1977), després de l'administració de 12.5 mg/kg per via i.v., el volum de distribució (Vd) de la tilosina va ser d'1.1 l/kg, el temps de vida mitjana d'eliminació ($t_{1/2\beta}$) d'1.6 h i l'aclariment plasmàtic (Cl) de 7.8 ml/kg/min. Cester i cols., (1993), després d'administrar 10 mg/kg de tilosina per via i.v. a vaques, trobaren volums de distribució lleugerament superiors, un $t_{1/2\beta}$ de gairebé el doble i una Cl de 0.4 ml/kg/min i que el fàrmac passava ràpidament al tracte genital, on els alts nivells assolits perduraven durant força temps. Ambdós treballs coincideixen en l'àmplia distribució de la tilosina cap als teixits i la ràpida eliminació del fàrmac una vegada aquest es troba a la sang.

Ziv i Sulman, (1973) van veure que la tilosina administrada per via i.v. en una dosi de 20 mg/kg a vaques i a ovelles presentava un volum de distribució similar a la resta dels remugants (1.5-1.6 L/kg) i que la seva concentració plasmàtica disminuïa lentament, trobant concentracions considerables a les 12 h posttractament. Administrada per via i.m., ràpidament es difonia cap a la llet i arribava a concentracions màximes més grans que les del plasma. Els mateixos autors, en un estudi fet en camells (Ziv i cols., 1995), van comprovar que la disposició del fàrmac era menor quan els animals eren privats d'aigua, i que en estat normal d'hidratació la seva disposició era d'un 88 % després d'administrar 20 mg/kg per via i.m..

El comportament de la tilosina després d'administrar-se per via i.v. també ha estat estudiat en vedells de diferents edats, i s'ha descobert que en vedells acabats de néixer l'eliminació de la tilosina era lenta però que augmentava ràpidament amb l'edat, fins a igualar la dels animals adults, quan els vedells tenien una setmana de vida; el Vd però, disminuïa amb l'edat d'acord amb la pèrdua progressiva de contingut d'aigua corporal (Burrows i cols., 1983).

En un estudi realitzat en cabres per (Atef i cols., 1991) en què es van administrar 15 mg/kg de tilosina per via i.v., es va trobar un Vd d'1.7 l/kg, un $t_{1/2\beta}$ de 3.04 h i una Cl de 6.8 ml/kg/min. Administrada i.m., també es va observar una absorció lenta des del múscul, però amb una alta biodisponibilitat del fàrmac (72.6 %). En cabres de raça Nubian, (Taha i cols., 1999) van descriure una biodisponibilitat molt alta (84 %) i un $t_{1/2\beta}$ molt similar. En ovelles del desert, el mateix autor no va trobar diferències respecte dels resultats observats en cabres.

En gossos, després de l'administració de 10 mg/kg de tilosina per via i.v. es va veure que el fàrmac es distribuïa àmpliament (1.7 ml/kg), que assolía valors molt similars als obtinguts en altres espècies (vaques i cabres) i que la seva eliminació era molt ràpida ($t_{1/2\beta} = 54$ min). Administrada per via i.m. la tilosina arribava als 30 min a una concentració màxima d'1.5 µg/ml que es mantenia fins als 60 min, i que disminuïa lentament fins a les 9 h (Weisel i cols., 1977).

Locke i cols., (1982) després d'estudiar la farmacocinètica de la tilosina en diferents espècies d'aus (guatlles, coloms, grues i estruços) administrada en una dosi de 25 mg/kg per via i.m., varen observar que el fàrmac assolía unes

concentracions màximes que podien variar entre els 3 i 6 µg/ml entre les 0.5 i 1.5 h. El $t_{1/2\beta}$ oscil·là entre 1.2 i 4.7 h.

1.2.6. Interaccions farmacològiques

No hi ha gaire informació sobre les interaccions medicamentoses amb la tilosina, però es creu que són semblants a les de l'eritromicina (Plumb, 1995). S'ha utilitzat en associació amb les sulfonamides en la clínica de petits animals per tractar infeccions de vies respiratòries altes, però no s'ha comprovat si l'associació és sinèrgica *in vitro*. També és sinèrgica amb el cloramfenicol, l'estreptomicina, la furazolidona i la sulfametazina, i inhibeix l'acció de les penicil·lines, les cefalosporines i les tetraciclines. Podria augmentar els nivells sanguinis de glicòsids digitàlics amb la conseqüent toxicitat.

1.2.7. Reaccions adverses

La seguretat de la tilosina en animals està ben documentada (Hamill i cols., 1961; Anderson i cols., 1966). La LD₅₀ (dosi letal 50) en porcs és de 5 g/kg per via oral i d'1 g/kg per via i.m..

Després de l'administració d'altres dosis úniques de tilosina a ratolins, rates i gossos s'ha demostrat l'elevat marge de seguretat del fàrmac. La LD₅₀ en rates i ratolins va resultar ser de 580-695 mg/kg per via intravenosa per a les diferents sals de tilosina. Dietes amb un contingut entre un 2 i un 5 % de tilosina van ser ben tolerades per rates durant 2 anys. Estudis realitzats en gossos van demostrar que dosis de 200 mg/kg administrades diàriament durant un període de 2 anys causaven pielonefritis en un 25% dels animals, i

que dosis de 400 mg/kg produïen en el mateix percentatge nefrosi bilateral, pielonefritis lleu i cistitis crònica. El NOEL es va establir en 10000 ppm en rates i en 4000 ppm en gossos (Anderson i cols., 1966).

La tilosina base i les seves sals tenen una baixa toxicitat aguda però en canvi, són antibiòtics que causen irritació i necrosi dels teixits en el punt d'injecció. Una prova d'aquest fet és l'augment de creatinaquinasa sèrica després de la seva administració per via i.m. (Gueorguieva i cols., 1998).

Les reaccions adverses més conegudes són: diarrea en cavalls, edema, pruija i prolapse rectal en porcs, anorèxia, atonia del rumen, hiperestèsia, decúbit i disminució de la producció de llet en vaques (Crossman i Poyser, 1981). Administrada per via i.v. a vedells, ha produït shock, dispnea i abatiment.

En professionals veterinaris, s'ha descrit dermatitis per contacte (Hjorth i Weisman, 1973; Hjorth i Roed-Petersen, 1980).

1.2.8. Indicacions terapèutiques

La tilosina posseeix més acció davant els micoplasmes que l'eritromicina.

Fins el juliol de 1999, la tilosina s'administrava a dosis baixes en animals d'engreix (porcs) per millorar l'índex de conversió del pinso; a partir d'aquesta data la tilosina es va classificar com a antibiòtic únicament d'ús terapèutic (Reglament (CE) 2821/98, 1998), i en va quedar prohibit l'ús com a promotor del creixement.

S'utilitza en bestiar boví, per a tractar la pneumònia causada per micoplasmes, la pododermatitis necròtica, la metritis, la queratoconjuntivitis infecciosa causada per *Moraxella bovis* i la mastitis deguda a bacteris grampositius, i també com a prevenció dels processos hepàtics causats per *Fusobacterium necrophorum* i *Actinomyces pyogenes* (Wilson, 1984). En vedells, s'utilitza per al tractament de la pneumònia i de l'artritis causada per *Mycoplasma bovis*.

En ovelles, per al tractament de l'agalaxia contagiosa causada per *Mycoplasma agalactiae* i per a l'eliminació d'ureaplasmes del tracte genital (Ball i McCaughey, 1987).

En cabres, s'ha fet servir en el tractament de les pleuropneumònies causades per micoplasmes (*Mycoplasma mycoides*) (Huber, 1988).

En porcs, és utilitzada per al tractament de la pneumònia, de la rinitis atròfica, —en particular, amb gran eficàcia sobre la produïda per *Pasteurella multocida*, malgrat tingui una CMI elevada— de l'erisipela, de l'artritis i per al control de la disenteria. El seu ús conjunt amb sulfonamides és efectiu per a tractar l'enteropatia hemorràgica proliferativa (McOrist i cols., 1997). També ha estat efectiva en el tractament de la leptospirosi induïda experimentalment (Alt i Bolin, 1996).

En gossos, s'utilitza per al tractament d'abscessos, piodèrnia, otitis externa, tonsil·litis, traqueobronquitis i pneumònia, metritis i cel·lulitis causats per estafilococs, estreptococs anaerobis i micoplasmes. Administrada en combinació amb sulfonamides és efectiva per al tractament d'infeccions del tracte respiratori superior (Ford i Aronson, 1985).

En gats, és efectiva per tractar també infeccions del tracte respiratori superior causades per *Chlamidia* i micoplasmes. També està descrit el seu ús en el tractament postoperatori (Jenkins, 1993).

En aus en general, s'utilitza contra els micoplasmes o microorganismes PPLO associats amb la malaltia respiratòria crònica (Clubb, 1986), com a profilaxi de l'espiroquetosi aviar i com a prevenció de la sinusitis infecciosa en galls d'indi. En pollastres s'utilitza per al tractament de l'enteritis necròtica causada per *Clostridium pergringens*.

En rèptils (tortugues) està descrita per al tractament d'infeccions respiratòries cròniques o quan hi ha sospita d'afeccions per *Mycoplasma* (Gauvin, 1993).

1.2.9. Contraindicacions

L'ús de la tilosina està contraindicat en animals que presentin hipersensibilitat a aquest compost o a d'altres macròlids. També està contraindicada en cavalls i altres èquids per provocar diarrea severa que pot arribar a causar la mort (Plumb, 1995).

Tampoc no es pot administrar en gallines en producció perquè l'ou pot contenir quantitats elevades de l'antibiòtic (Sumano i Ocampo, 1997).

No hi ha informació sobre la innocuïtat de la tilosina administrada en la gestació, però no es creu que tingui un potencial teratogen seriós. Es recomana no administrar-la en femelles lactants, ja que una de les vies d'eliminació del fàrmac és la llet.

1.2.10. Estudis de depleció de residus de tilosina

La majoria d'estudis referents a la depleció de residus fan referència a l'administració oral de la tilosina. En l'espècie porcina (Valdebouze i cols., 1970) descriuen que després d'administrar pinso amb un contingut de tilosina de 100 mg/kg van trobar residus en fetge, ronyó i múscul per sobre de l'LMR. Kline i Waitt, (1971) també trobaren residus en fetge de porcs després d'administrar en pinso 1000 i 500 mg/kg de tilosina, respectivament. Sieck (1978), en un estudi en què administrava pinso amb 110 mg/kg de tilosina, trobà menys de 280 i de 40 µg/kg de tilosina en fetge i ronyó i múscul i greix, respectivament. Vassilopoulos i cols., (1979) no van trobar residus després d'administrar 20 mg/kg de tilosina en el pinso a les 48 h de sacrifici, ni tampoc a les 24 h de sacrifici després de donar una dosi 10 vegades major (Dvorak i cols., 1982). Lauridsen i cols., (1988), després d'alimentar porcs amb pinso que contenia diferents quantitats de tilosina, trobaren que amb dosis de 40 a 50 mg/kg no s'observaven residus a temps de sacrifici zero, en canvi, quan es donaven entre 200 i 400 mg/kg es trobaven concentracions de 60 µg/kg en fetge i ronyó en un període de sacrifici de 3 h postractament. En galls d'indi als quals se'ls va donar 500 mg/L de tartrat de tilosina en aigua de beguda s'hi van trobar concentracions de fàrmac per sota de 50 µg/kg en tots els teixits en temps de sacrifici zero (Montesissa i cols., 1999).

També hi ha poca informació sobre la depleció de la tilosina després de la seva administració per via i.m.. Hi ha estudis realitzats en vedells (Nouws i Ziv, 1977) i també en pollastres (Nogawa i cols., 1982). En vedells, no es van trobar residus en múscul a les 24 h de supressió del tractament a dosi

terapèutica però sí a les 31 h en fetge i ronyó. En pollastres, després d'administrar 62.5 mg de tilosina, es van detectar residus en el punt d'injecció, múscul, fetge i ronyó als 25, 3, 6, i 5 dies respectivament.

Pel que fa a estudis de depleció de la tilosina quan s'administra per via i.m. a porcs, tampoc no es troben gaires dades: Moats i cols., (1985) van descriure que després d'una administració i.m. de 8.8 mg/kg de tilosina s'hi trobaven residus per sota dels 200 µg/kg en tots els teixits a les 24 h de l'administració, però en canvi, no se n'hi trobaven a les 48 h posttractament.

I. OBJECTIUS

L'existència d'una escassa documentació sobre la disposició per via i.m. d'antibiòtics com la tilosina, macròlid molt utilitzat en el tractament de patologies bovines i porcines d'aparició freqüent, i sobre la cinètica plasmàtica i la disposició en l'organisme d'aquesta, han fet que fos primordial aprofundir en aquest camp per, així, conèixer l'eficàcia terapèutica d'aquesta molècula en el lloc on es produeix la infecció.

Actualment, el control dels residus d'antibiòtics i d'altres molècules farmacològicament actives en teixits procedents d'animals destinats al consum humà ha esdevingut d'una importància cabdal, a causa dels possibles efectes indesitjables que poden comportar, com de la problemàtica originada pel desenvolupament de noves resistències bacterianes per un ús inadequat d'aquests antibacterians.

Per aquest motiu, últimament ha crescut l'interès per disposar de nous mètodes d'anàlisi, més senzills, sensibles i fiables que permetin assegurar que les concentracions dels fàrmacs en els teixits es troben per sota dels LMR fixats per la legislació, i així avaluar el temps d'espera que garantirà que els teixits procedents d'animals tractats, arribin a la cadena alimentària sense risc per al consumidor.

Per totes aquestes raons s'han plantejat com a objectius d'aquest treball els següents:

- Estudiar el perfil cinètic de la tilosina després de l'administració intravenosa i intramuscular d'una dosi única de 20 mg/kg a vedells i de 10 mg/kg a porcs.

- Avaluar la relació del perfil cinètic de la tilosina amb l'eficàcia d'aquesta envers bacteris patògens que freqüentment afecten a les produccions de vacum i de porcí.
- Estudiar la depleció de la tilosina en els diferents teixits diana establerts per a l'espècie bovina i porcina, després de la seva administració per via i.m. d'acord amb la dosi i la pauta terapèutica recomanades per a aquestes dues espècies animals.
- Conèixer el temps d'espera necessari després de l'administració intramuscular de tilosina d'acord amb la dosi i la pauta terapèutica recomanades en vedells i en porcs perquè els nivells de tilosina en els teixits diana no superin el límit màxim de residus fixat per a aquest fàrmac, i per tant, que el seu ús no representi cap risc per a la salut del consumidor d'aquests teixits.
- Disposar d'un mètode d'anàlisi precís, exacte i amb un límit de quantificació adequat que permeti determinar quins són els nivells de fàrmac que es troben en el plasma dels animals tractats amb tilosina d'acord amb la dosi i la via escollida.
- Desenvolupar un mètode analític fiable per a la detecció i la quantificació de la tilosina en les mostres procedents dels teixits diana fixats per la legislació per a les espècies bovina i porcina, en un rang de concentracions entre la meitat del límit màxim de residus fixat per la tilosina i fins 5 vegades superior a aquest valor, que permeti avaluar les concentracions tissulars d'aquest fàrmac.

III. MATERIAL I MÈTODES

3.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I A PORCS

3.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells

Prèviament a la realització de l'estudi de la biodisponibilitat de la tilosina en aquesta espècie en una dosi de 20 mg/kg, es va realitzar una prova pilot en què es va assajar amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg per via i.m. per veure quines eren les concentracions plasmàtiques assolides i quina disposició tenia el fàrmac en aquesta espècie.

3.1.1.1. Estudi pilot

3.1.1.1.1. Fàrmac utilitzat

Per dur a terme l'experiment es va utilitzar una solució injectable de tilosina base, (Tilosina 200) cedida per LABIANA Life Sciences (Terrassa, Barcelona). La concentració de la solució fou de 200 mg/ml. L'excipient de la solució estava constituït per propilenglicol, aigua i un 3 % d'alcohol benzílic.

3.1.1.1.2. Animals

Per a fer aquest estudi es varen utilitzar quatre vedells femella, sans, de raça frisona i de 4-5 mesos d'edat amb un pes mitjà de 125 ± 3.7 kg a l'inici de l'estudi.

Els vedells provenien d'una granja d'engreix acreditada, *La Pedrosa* de Masquefa (Barcelona), on es va realitzar l'experiment. Els animals van ser separats del grup i estabulats lliurement en el lloc on es duria a terme l'experiment.

Abans de començar l'estudi, els animals van ser sotmesos a un període de blanqueig de 15 dies de durada, per garantir que en cas d'haver rebut alguna medicació prèvia, aquesta pogués ser eliminada i així evitar qualsevol interferència amb el fàrmac objecte de l'estudi. Aquest temps, també va servir a l'hora per a l'adaptació dels animals al nou lloc d'estabulació, i d'aquesta manera impedir un possible estrès afegit en el moment de començar l'estudi.

L'alimentació rebuda durant aquest període previ i durant l'experiment va estar constituïda per palla i pinso. El pinso era compost de blat de moro i ordi, complementat amb farina de soja, segones de blat, polpa de remolatxa, gluten i sèu de vacum, tot suplementat amb fosfat, bicarbonat, carbonat càlcic i sal.

Abans del tractament, els animals van estar en dejú 12 h i fins 4 h després de l'administració del fàrmac, però disposaven d'aigua *ad libitum*.

3.1.1.1.3. Protocol experimental

El tractament es va realitzar administrant una dosi única de 10 mg/kg de *Tilosina 200* per via i.m.. El fàrmac va ser administrat al múscul braquicefàlic situat al coll. Es van prendre mostres de sang a partir de la vena jugular, abans del tractament (temps 0) i als 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120

i 150 min, i a les 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48 i 72 h després del tractament. Les mostres de sang (10 ml) es recolliren en tubs de polietilè que contenen heparina com a anticoagulant.

El plasma, obtingut per centrifugació a 1932 g durant 20 min, es va emmagatzemar en tubs de polietilè, repartida cada mostra recollida en 2 tubs, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fins al moment de l'anàlisi.

Tot el protocol experimental va ser aprovat per la Comissió Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.1.2. *Estudi del perfil cinètic de la tilosina administrada per via i.v. i i.m.*

3.1.1.2.1. Fàrmac utilitzat

Per a fer aquest experiment es va emprar el mateix fàrmac que per al de la dosi de 10 mg/kg referit a l'apartat 3.1.1.1.1..

3.1.1.2.2. Animals

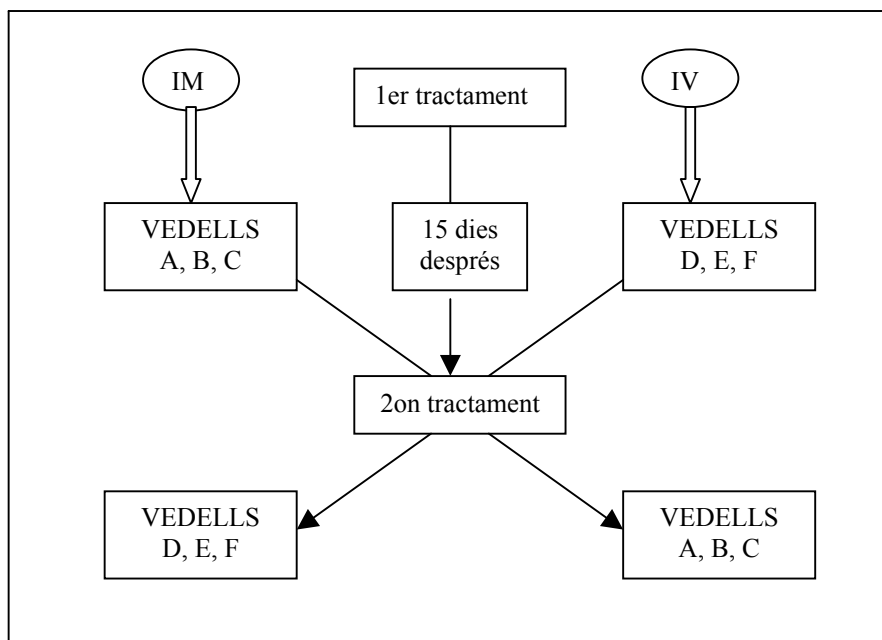
Es van utilitzar sis vedells femella, sans, de raça frisona i de 4-5 mesos d'edat, amb un pes mitjà de 112 ± 5.4 kg a l'inici de l'estudi. Aquests animals van ser proporcionats per la mateixa granja i estabulats i alimentats d'acord amb les mateixes directrius descrites a l'apartat 3.1.1.1.2..

3.1.1.2.3. Protocol experimental

El tractament es va realitzar d'acord amb un model creuat segons el qual s'administra una dosi única de Tilosina 200 de 10 mg/kg per via i.v. i de 20 mg/kg per via i.m., respectivament.

En una primera fase, el fàrmac es va administrar a 3 animals per via i.m. i a 3 animals per via i.v.. Després de 15 dies de període de blanqueig es va tornar a administrar als mateixos animals, però per la via d'administració contrària a la utilitzada en el primer tractament per a cada grup. L'esquema que es va seguir està representat a la figura 4.

Figura 4. Esquema dels tractaments de tilosina administrats a 6 vedells seguint un model creuat.



El fàrmac va ser administrat per la vena auricular en el cas de l'administració i.v. i en el múscul braquicefàlic situat al coll, en el cas de l'administració i.m.. Es van prendre mostres de sang a partir de la vena jugular, abans del tractament (temps 0) i als 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 min i a les 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48 i 72 h postadministració. La dosi administrada es va repartir en tots dos costats del coll, atès que es tractava d'un volum elevat (>10 ml).

El plasma, obtingut per centrifugació a 1932 g durant 20 min, es va emmagatzemar en tubs de polietilè, repartida cada mostra recollida en 2 tubs, a -80°C, fins al moment de l'anàlisi.

Tot el protocol experimental va ser aprovat per la Comissió Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs

3.1.2.1. *Estudi del perfil cinètic de la tilosina administrada per via i.v. i i.m.*

3.1.2.1.1. Fàrmac utilitzat

El fàrmac que es va utilitzar en l'administració i.m. va ser el mateix referit a l'apartat 3.1.1.1.1. Per a l'administració i.v. es va preparar una solució de fosfat de tilosina d'una concentració de 70 mg/ml. Per preparar-la es van diluir 0.8 g de fosfat de tilosina en 11.5 ml d'aigua bidestil·lada, etanol 96 % i àcid fosfòric 85 %/H₂O (1:1000) en la proporció (19:1:3).

3.1.2.1.2. Animals

Per a fer aquest estudi es varen utilitzar sis porcs femella, sans, de raça creuada (Largewhite x Landrace), de 3-4 mesos d'edat i d'un pes a l'inici de l'estudi de 21 ± 1.64 kg .

Els porcs provenien d'una granja d'engreix acreditada, *Can Mariné* de Granollers (Barcelona). L'experiment es va realitzar a les instal·lacions de la granja experimental *Salud y Bienestar Animal* situada a Bigues i Riells (Barcelona).

Durant el temps que durà l'experiment, els porcs van rebre una dieta de pinso de creixement a base de grans de cereals, oleaginoses, olis, greixos, vitamines i coure i aigua *ad libitum*, sense cap substància medicamentosa afegida.

Una vegada instal·lats al lloc on es duria a terme l'experiment, els animals van ser sotmesos a un període de blanqueig de 15 dies de durada.

Abans d'iniciar l'administració del fàrmac, els animals van estar en dejú durant 12 h i fins a 4 h després, però disposaven d'aigua *ad libitum*.

3.1.2.1.3. Protocol experimental

El tractament es va realitzar segons un model creuat, d'acord amb el qual es va administrar fosfat de tilosina, en el cas de l'administració i.v., i Tilosina 200, en el cas de l'administració per via i.m., en dosis úniques de 10 mg/kg, respectivament.

En una primera fase, el fàrmac es va administrar a 3 animals per via i.m. i a 3 animals per via i.v.. Després de 15 dies de període de blanqueig es va tornar a administrar als mateixos animals, però per la via d'administració contrària a la utilitzada en el primer tractament per a cada grup.

El fàrmac va ser administrat per la vena auricular en el cas de l'administració i.v. i en el múscul braquicefàlic, situat al coll, en el cas de l'administració i.m.. La dosi de fàrmac i.m. es va administrar en un únic costat del coll atès que es tractava d'un volum petit (< 5 ml).

Es van prendre mostres de sang a partir de la vena jugular, abans del tractament (temps 0) i als 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 min, i a les 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 24, 36, 48 i 72 h després del tractament. Les mostres de sang (2-5 ml) es recolliren en tubs de vidre (Venoject) que contenien heparina de liti com a anticoagulant.

El plasma, obtingut per centrifugació a 1932 g durant 20 min, es va emmagatzemar en tubs de polietilè, repartida cada mostra recollida en 2 tubs, a -80 °C, fins al moment de l'anàlisi.

Tot el protocol experimental va ser aprovat per la Comissió Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.3. Anàlisi farmacocinètica

Per a l'anàlisi dels paràmetres farmacocinètics, es van construir les corbes de nivells plasmàtics respecte al temps per a cadascun dels animals objecte de l'estudi i per a ambdues vies d'administració del fàrmac.

L'anàlisi de les corbes es realitzà mitjançant el programa informàtic PK Solutions (Farrier, 1997) basat en moments estadístics (Wagner, 1993).

En el model no compartimental, l'àrea sota la corba de nivells plasmàtics (AUC) és el moment zero, i es pot calcular a partir del mètode de la suma dels trapezoides des de zero a t.

$$AUC_0^t = \frac{(C_0+C_1)}{2} (t_1-t_0) + \frac{(C_1+C_2)}{2} (t_2-t_1) + \dots + \frac{(C_{n-1}+C_n)}{2} (t_n-t_{n-1}) = \int_0^t \Sigma f(C) dt$$

El temps mig de residència (MRT) és el primer moment i es calcula com,

$$MRT = \frac{\int_0^n t \cdot C dt}{\int_0^n C dt} = \frac{AUMC}{AUC}$$

En què AUMC és l'àrea sota la corba de les concentracions plasmàtiques del fàrmac multiplicada per cada temps en què s'obté la mostra, posteriorment a l'administració del fàrmac.

També es determinà la semivida biològica de la fase lenta de disposició del fàrmac ($t_{1/2\beta}$), que es calcula utilitzant la constant de velocitat β , corresponent al pendent de la fase exponencial terminal de la corba de nivells plasmàtics, i per regressió lineal del logaritme neperià de les concentracions versus el temps.

$$t_{1/2\beta} = \frac{0.693}{\beta}$$

Al mateix temps es varen determinar, a partir de la corba de nivells plasmàtics corresponent a la via intravenosa:

El volum de distribució ($V_{d_{area}}$)

$$V_{d_{area}} = \frac{Dosi}{AUC_0^{\infty} \beta}$$

El volum de distribució en l'estat estacionari ($V_{d_{ss}}$), que és el volum aquós de l'organisme en el qual és capaç de distribuir-se una quantitat determinada de fàrmac, d'acord amb les seves característiques físicoquímiques.

$$V_{d_{ss}} = MRT \cdot Cl$$

- La depuració (Cl) o el volum de sang totalment depurat de fàrmac per unitat de temps.

$$Cl = \frac{Dosi}{AUC_0^{\infty}}$$

Per a la via intramuscular es calcularen, a més de l'AUC, l'MRT i el $t_{1/2 \beta}$:

- La biodisponibilitat (F), que és el paràmetre que mesura el percentatge de fàrmac que arriba a la sang des del lloc on ha estat administrat, i que es pot calcular a partir de la corba de nivells plasmàtics com la fracció de la dosi que accedeix inalterada a la circulació sistèmica.

$$F = \frac{\frac{AUC_{0}^{t}_{ev}}{Dosi_{ev}}}{\frac{AUC_{0}^{t}_{iv}}{Dosi_{iv}}} \cdot 100$$

Aquest paràmetre es pot veure influït per factors relacionats amb el principi actiu, amb la forma de dosificació o pels factors fisiològics o patològics en què es trobi l'individu.

- El temps mig d'absorció (MAT), que és l'aplicació del concepte del temps mig de residència al procés d'absorció.

$$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}$$

- La concentració màxima (C_{max}) i el temps en què s'obté aquesta concentració màxima (t_{max}) es van obtenir de la lectura directa (valor experimental) de cadascuna de les corbes de nivells plasmàtics.

Per la major part dels paràmetres farmacocinètics s'ha calculat la mitjana, a excepció dels paràmetres MRT i $t_{1/2\beta}$ per als quals s'ha calculat la mitjana harmònica.

3.1.4. Anàlisi estadística

Els paràmetres farmacocinètics (AUC, MRT, i $t_{1/2\beta}$) corresponents a les administracions de tilosina per les vies i.v. i i.m. en les espècies bovina i porcina van ser tractats estadísticament mitjançant el test no paramètric de

Wilcoxon, en què es van considerar les diferències estadísticament significatives per a una $p \leq 0.05$.

Com que la dosi administrada per a l'estudi descrit a l'apartat 3.1.1.2. fou diferent per a ambdues vies d'administració, el paràmetre AUC va ser corregit per la dosi prèviament a l'anàlisi estadística, atès que es tracta d'un paràmetre que depèn en alt grau de la dosi que s'administra.

3.1.5. Avaluació de l'eficàcia terapèutica

Per a l'estudi de l'eficàcia terapèutica de la tilosina davant els diferents microorganismes causants de les malalties més importants en les espècies bovina i porcina i per a les quals se'n recomana l'ús, s'ha fet una recerca bibliogràfica de les CMI existents (90 o 50, segons el cas) d'aquests microorganismes en qüestió, i s'han recollit les dades aconseguides per al seu tractament matemàtic, és a dir, per al càlcul dels índexs d'eficàcia que s'utilitzen en medicina humana i veterinària, i així valorar l'eficàcia dels fàrmacs utilitzats davant d'una determinada infecció.

Segons Gunderson i cols., (2001) i Sánchez, (2000), els índexs d'eficàcia més emprats i els valors que s'han de prendre per a considerar el fàrmac com a efectiu són:

$$C_{\max}/CMI > 10$$

$$AUC_{0-24h}/CMI > 125$$

$$T > CMI (\%) \geq 50$$

3.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAMUSCULAR A VEDELLS I A PORCS

3.2.1. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en vedells

3.2.1.1. Fàrmac utilitzat

El fàrmac utilitzat va ser una solució injectable de tilosina base (*Tilosina 200*), cedida per LABIANA Life Sciences (Terrassa, Barcelona). La concentració de la solució fou de 200 mg/ml. L'excipient de la solució estava constituït per propilenglicol, aigua i un 3 % d'alcohol benzilic.

3.2.1.2. Animals

Per a fer aquest estudi es van utilitzar 12 vedells, femella, sans, de raça frisona amb pesos entre 125-150 kg, a l'inici de l'estudi.

Els animals procedien d'una granja d'engreix certificada, *La Pedrosa*, de Masquefa (Barcelona) i rebien una dieta, lliure de fàrmacs, a base de blat de moro i ordi, complementada amb farina de soja, segones de blat, polpa de remolatxa, gluten i sèu de vacum, tot suplementat amb fosfat, bicarbonat, carbonat càlcic i sal i aigua *ad libitum*.

L'experiment es va dur a terme a les instal·lacions de la granja, on els animals van ser separats del grup i van ser sotmesos a un període de blanqueig de 15 dies i d'aclimatació al nou lloc d'estabulació.

3.2.1.3. Protocol experimental

Per realitzar l'estudi es va administrar a les 12 vedelles una dosi de 20 mg/kg per via i.m., equivalent a 1 ml/10 kg del fàrmac, cada 24 h i durant 5 dies, que és la pauta terapèutica recomanada per l'especialitat.

La formulació va ser administrada al múscul del coll i repartida entre tots dos costats, atès que es tractava d'un volum elevat (>10 ml).

Posteriorment, els animals van ser sacrificats a l'escorxador en grups de 4, als 7, 14 i 21 dies postadministració.

Es varen prendre mostres representatives dels diferents teixits diana dels animals sacrificats de la següent manera:

- Múscul: el lloc dels dos costats, 500 g de teixit de cada costat.
- Fetge: 500 g de teixit de diferents zones de l'òrgan.
- Ronyó: tots dos ronyons.
- Greix: el greix subcutani de la zona dorsal (500 g).
- Punt d'injecció: una mostra representativa de tots dos costats del coll (15 cm de diàmetre i 300 g de pes).

Les mostres de cada un dels teixits van ser triturades i identificades convenientment. Seguidament, les mostres van ser introduïdes en pots de polietilè de 50 g de capacitat, per duplicat i emmagatzemades a – 80 °C fins el moment de l'anàlisi.

Tot el protocol experimental va ser aprovat per la Comissió Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.5. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en porcs

3.2.2.1. Fàrmac utilitzat

El fàrmac utilitzat va ser una solució injectable de tilosina base (*Tilosina 200*), cedida per LABIANA Life Sciences (Terrassa, Barcelona). La concentració de la solució fou de 200 mg/ml. L'excipient de la solució estava constituït per propilenglicol, aigua i un 3 % d'alcohol benzílic.

3.2.2.2. Animals

Per a fer aquest estudi de residus es van utilitzar 16 porcs, mascle, sans, de raça creuada (Largewhite x Landrace) amb pesos entre 28-32 kg a l'inici de l'estudi. Els animals procedien d'una granja certificada, *Granja Rosita*, de Cerdanyola del Vallès (Barcelona) i van ser allotjats a les instal·lacions de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Els porcs van rebre una dieta de pinso, lliure de fàrmacs, a base de grans de cereals, oleaginoses, olis, greixos, vitamines i coure i aigua *ad libitum*.

3.2.2.3. Protocol experimental

Per a la realització d'aquest estudi es va administrar a 16 porcs una dosi de 10 mg/kg per via i.m., equivalent a 0.5 ml/10 kg del fàrmac, cada 24 h i durant 5 dies, segons la pauta terapèutica recomanada. La formulació es va

administrar al múscul del coll. Posteriorment els animals es van sacrificar en grups de 4, als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració. Prèviament al sacrifici, els animals van ser tranquil·litzats amb Imalgene (clorhidrat de cetamina) a la dosi recomanada (15 mg/kg via intramuscular).

Una vegada sacrificats, es procedí a prendre mostres dels diferents teixits diana de la manera següent:

- Múscul: el lloc dels dos costats, 250 g de teixit de cada costat.
- Fetge: 250 g de teixit de diferents zones de l'òrgan.
- Ronyó: tots dos ronyons.
- Pell+greix: 100-150 g de la zona dorsal de l'espatlla.
- Punt d'injecció: una mostra representativa del costat del coll que va ser injectat per última vegada amb el fàrmac. Atès que es tractava d'animals petits, aquesta part corresponia a tot el múscul del coll (10 cm de diàmetre i 300 g de pes).

Les mostres de cada un dels teixits van ser triturades i convenientment identificades. Seguidament, van ser introduïdes en pots de polietilè de 50 g de capacitat, per duplicat i emmagatzemades a – 80 °C fins el moment de la seva anàlisi.

Tot el protocol experimental va ser aprovat per la Comissió Ètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2.3. Càlcul del temps d'espera

Normalment, el càlcul del temps d'espera es fa utilitzant un càlcul estadístic basat en els principis farmacocinètics, els quals consideren que en el moment de presa de mostres, el fàrmac es troba en una fase d'eliminació lineal en què la corba de nivells tissulars respecte al temps, expressada de forma logarítmica, segueix una recta amb un pendent més o menys elevat segons la velocitat d'eliminació del fàrmac des de cadascun dels teixits diana. A vegades, les dades obtingudes no permeten l'ús d'aquest model quan la majoria dels valors es troben per sota del límit de quantificació. En aquest cas, el CVMP *Committee for Veterinary Medicinal Products* de l'EMEA *Agència Europea per a l'Avaluació de Medicaments* recomana una aproximació per a estimar el temps d'espera (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996) que consisteix a prendre el temps en què tots els teixits tenen concentracions per sota de l'LMR i aplicar-l'hi un marge de seguretat entre el 10 % i el 30 %.

El model estadístic que s'ha aplicat en el càlcul del temps d'espera és el programa estadístic proporcionat per l'IAP (Institute of Applied Pharmacokinetics) versió WT 1.4 (Hekman, 2001). L'anàlisi estadística realitzada a partir de les concentracions tissulars trobades s'ha fet d'acord amb les recomanacions del CVMP (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996) amb un límit de tolerància del 95 % i un interval de confiança del 95 %.

En aquest estudi, per a dur terme el càlcul del temps d'espera s'ha aplicat en les dues espècies tant el model estadístic proporcionat per l'IAP com l'aproximació recomanada per l'EMEA del marge de seguretat del 30 %,

amb l'objectiu de poder comparar els resultats obtinguts per els dos procediments, i així avaluar les possibles diferències existents.

IV. RESULTATS

4.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I A PORCS

4.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells

4.1.1.1. *Estudi pilot*

Els valors de les concentracions plasmàtiques de tilosina respecte al temps, posterior a l'administració del fàrmac en els 4 vedells estudiats, en portar a terme la prova pilot, on es va administrar als animals la dosi de 10 mg/kg, es poden veure a la taula 3. Aquesta taula mostra els valors trobats de tilosina fins a l'últim temps de mostreig en què es van trobar nivells quantificables de fàrmac, tot i que el darrer temps d'obtenció de mostres fou a les 72 hores.

Taula 3. Concentracions plasmàtiques de tilosina en vedells després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg /kg.

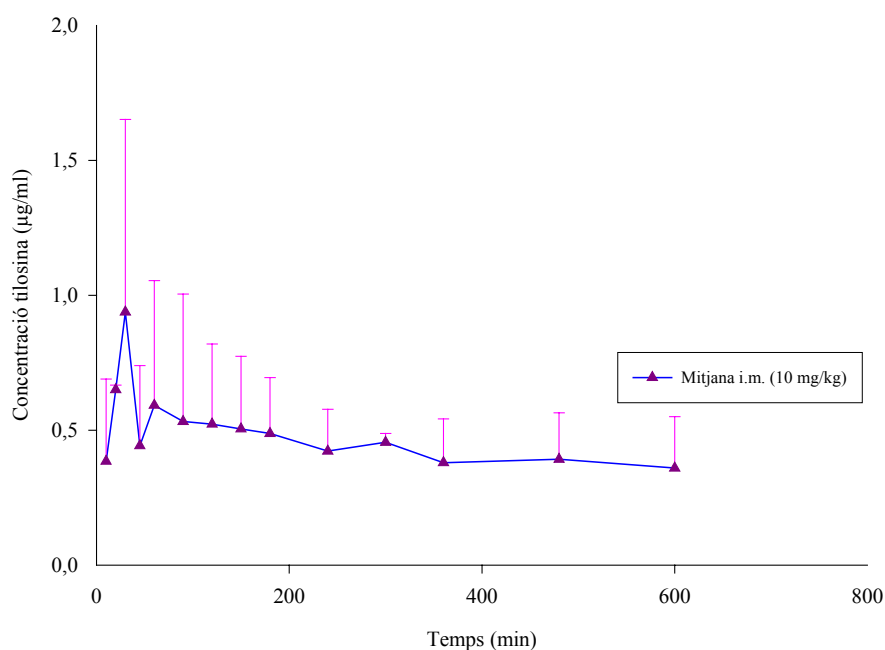
Temps (min)	Concentracions plasmàtiques ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				X \pm D.E.
	Animal				
	1	2	3	4	
10	0.59	0.15	0.10	0.7	0.38 \pm 0.30
20	-	0.67	0.64	0.64	0.65 \pm 0.02
30	1.96	0.31	0.81	0.67	0.94 \pm 0.71
45	0.67	0.29	0.10	0.71	0.44 \pm 0.30
60	1.15	0.31	0.13	0.78	0.59 \pm 0.46
90	1.06	0.17	0.10	0.80	0.53 \pm 0.47
120	0.74	0.53	0.10	0.72	0.52 \pm 0.30
150	0.74	0.50	0.13	0.65	0.50 \pm 0.27
180	0.56	0.50	0.20	0.69	0.49 \pm 0.21
240	0.56	0.46	0.20	0.47	0.42 \pm 0.15
300	0.41	0.46	0.49	0.46	0.45 \pm 0.03
360	0.53	0.41	0.15	0.43	0.38 \pm 0.16
480	0.46	0.55	0.15	0.41	0.39 \pm 0.17
600	NQ	0.50	0.23	NQ	0.36 \pm 0.194

NQ: Nivells plasmàtics per sota del límit de quantificació.

De les 10 fins a les 72 hores postadministració no es van trobar nivells quantificables de tilosina en plasma.

A la figura 5 es representa la corba de les concentracions plasmàtiques mitjanes de tilosina respecte al temps, corresponents als valors que es troben a la taula 3.

Figura 5. Concentracions plasmàtiques mitjanes de tilosina en vedells després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.



Després d'administrar el fàrmac per via i.m., s'observa que la tilosina s'absorbeix ràpidament, es troben concentracions als 10 min i s'assoleix la concentració màxima als 30 min de l'administració. A partir de la mitja hora postadministració, les concentracions disminueixen lentament, s'observa un

replà de nivells plasmàtics durant les primeres 5 hores, i passades 10 hores de l'administració del fàrmac, la tilosina ja no es detecta.

Els paràmetres farmacocinètics de la tilosina resultants de l'anàlisi matemàtica d'aquestes corbes de nivells plasmàtics respecte al temps, corresponents a l'estudi pilot, es troben a la taula 4.

Taula 4. Paràmetres farmacocinètics de la tilosina després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a vedells.

<i>Paràmetres</i>	<i>Animal</i>					
	1	2	3	4	X	D.E.
AUC_0^t ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	314.0	270	127.6	265.2	244.2	80.8
MRT (min)	823.5	1398	1586.3	1613.3	1257.9 [•]	367.2
$t_{1/2\beta}$ (min)	586.9	872.6	811.4	1160.7	857.9 [•]	236.3
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2	0.7	0.8	0.8	1.1	0.6
t_{max} (min)	30	20	30	90	42.5	32

- Mitjana harmònica.

En avaluar aquests paràmetres farmacocinètics obtinguts després de l'administració per via i.m., es pot observar una significativa variabilitat entre els diferents animals tractats pel que fa als paràmetres MRT, t_{max} i $t_{1/2\beta}$.

4.1.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina administrada per via i.v. i i.m.

La dosi a avaluar va ésser 20 mg/kg per via i.m., ja que les concentracions plasmàtiques quan es va administrar la dosi de 10 mg/kg varen ésser relativament baixes. Tot i que es va utilitzar la via i.v. per a conèixer la biodisponibilitat del fàrmac, per aquesta via es va aplicar una dosi meitat a la usada per via i.m., per evitar reaccions adverses degudes a les

concentracions plasmàtiques assolides, al aplicar un bolus d'una dosi total al voltant de 2,2 g de tilosina (20 mg/kg x 112 kg de pes corporal).

A la taula 5 s'han expressat els valors de concentracions plasmàtiques obtingudes quan la tilosina es va administrar per via i.v..

Taula 5. Concentracions plasmàtiques de la tilosina en vedells després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

Temps (min)	Concentracions plasmàtiques ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						X\pmD.E.
	Animal						
	A	B	C	D	E	F	
2	16.8	-	14.68	18.91	26.23	28.2	20.96 \pm 5.94
5	7.46	-	8.58	7.53	9.98	12.9	9.29 \pm 2.26
10	5.16	9.80	4.76	3.96	6.22	6.92	6.14 \pm 2.08
15	3.94	4.48	4.12	3.03	4.18	4.86	4.10 \pm 0.62
20	3.06	4.0	3.98	1.46	2.87	2.44	2.97 \pm 0.97
30	1.66	-	2.06	1.36	2.86	1.3	1.85 \pm 0.64
45	1.22	3.72	1.14	0.72	1.65	0.52	1.50 \pm 1.16
60	0.80	1.82	1.10	0.62	0.53	0.32	0.87 \pm 0.54
90	0.50	0.78	0.64	0.68	0.33	NQ	0.59 \pm 0.17
120	0.48	0.42	0.50	0.54	0.11	NQ	0.41 \pm 0.17
150	0.30	0.50	0.36	0.62	0.12	NQ	0.38 \pm 0.19
180	0.19	0.50	0.28	0.27	0.11	NQ	0.27 \pm 0.15
240	0.15	NQ	0.10	NQ	NQ	0.26	0.17 \pm 0.08
300	0.14	0.34	NQ	0.18	NQ	NQ	0.22 \pm 0.11
360	0.16	0.26	NQ	NQ	NQ	NQ	0.21 \pm 0.07
480	0.12	0.20	NQ	NQ	NQ	0.09	0.14 \pm 0.06
600	0.12	0.14	0.08	0.14	0.08	0.08	0.11 \pm 0.001
1440	NQ	0.10	NQ	NQ	NQ	NQ	0.10

NQ: Nivells plasmàtics per sota del límit de quantificació

A les figures 6 a 11 es representen les corbes de nivells plasmàtics de tilosina respecte al temps, corresponents a l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg als vedells objecte d'aquest estudi.

Figura 6. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell A després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

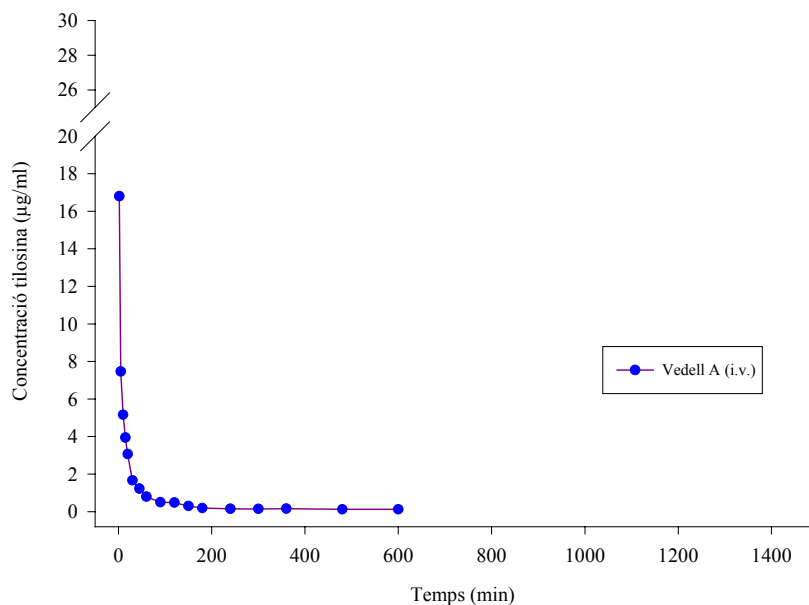


Figura 7. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell B després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

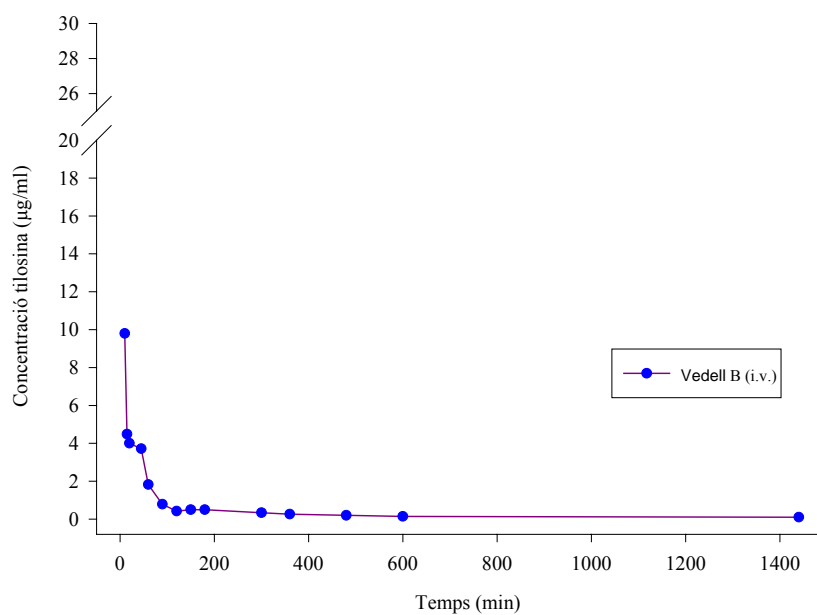


Figura 8. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell C després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

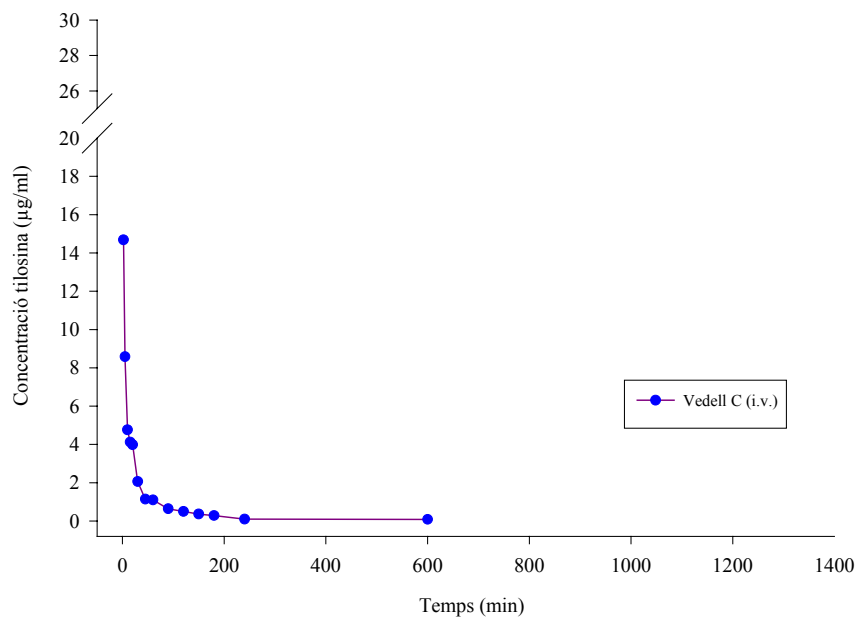


Figura 9. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell D després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

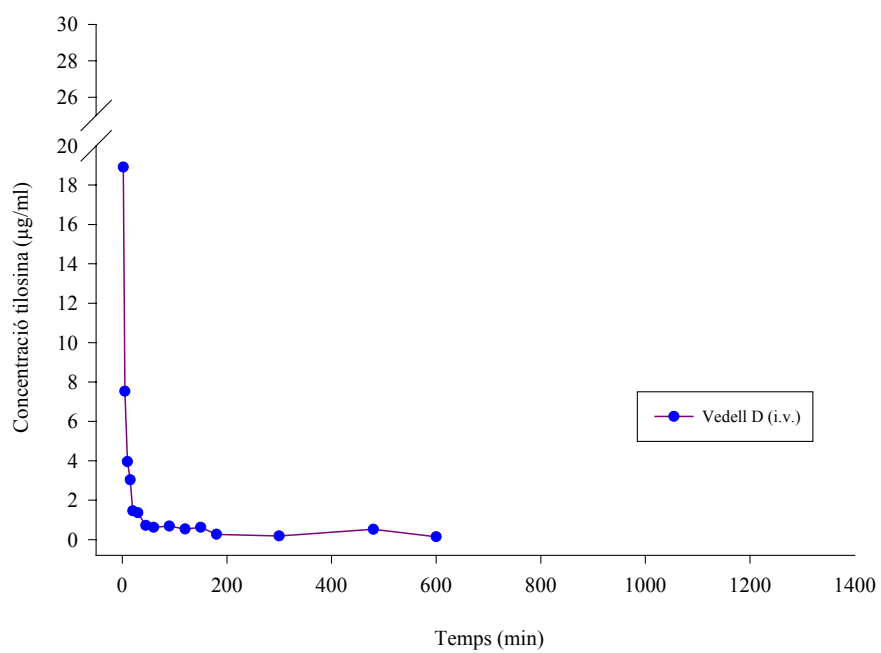


Figura 10. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell E després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

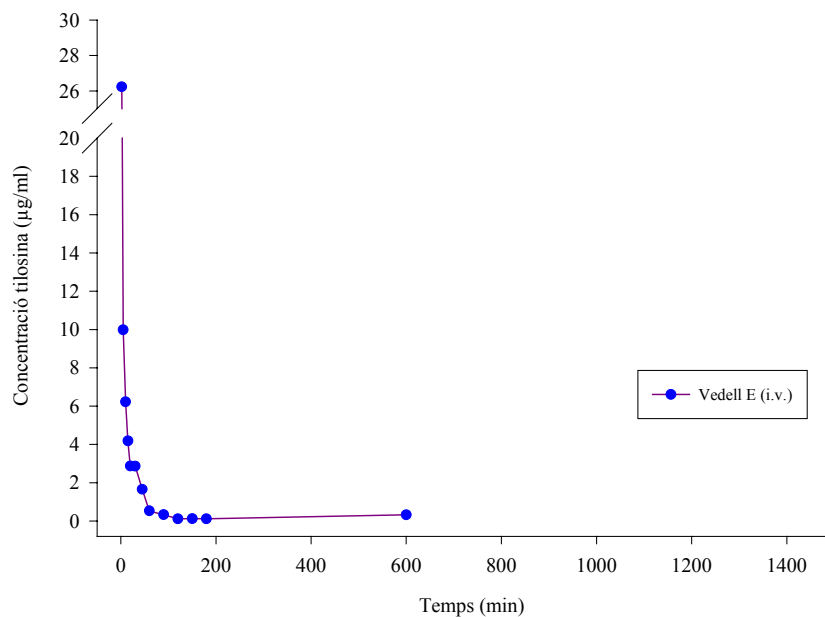
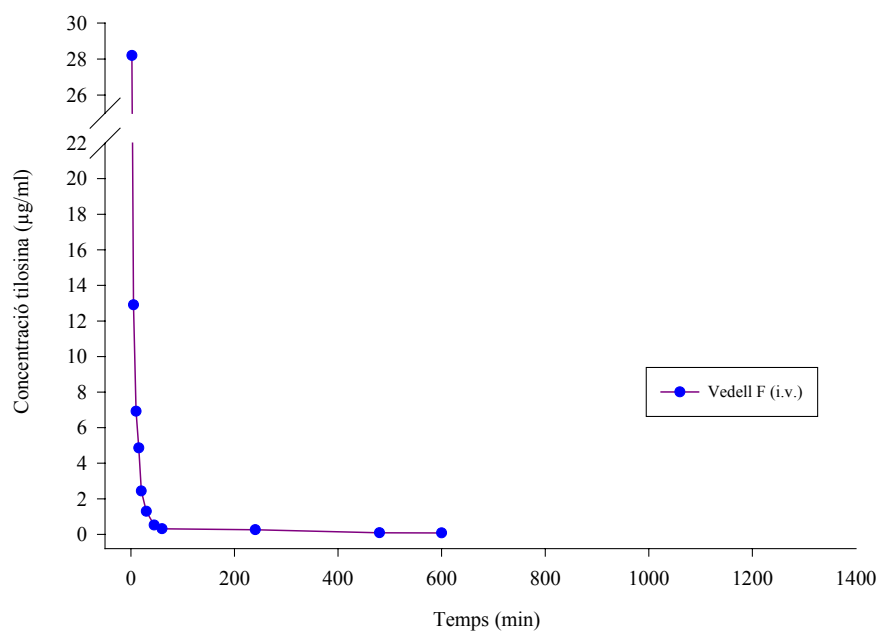


Figura 11. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell F després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.



Com es pot apreciar a les figures, després de l'administració i.v. del fàrmac, s'observa una disminució ràpida de les concentracions plasmàtiques durant la primera hora, que es mantenen baixes i bastant constants des de la tercera hora fins a la desena hora postadministració, i que es poden detectar concentracions fins al dia següent de l'administració del fàrmac.

Els paràmetres farmacocinètics resultants de l'anàlisi matemàtica de les corbes de nivells plasmàtics de la tilosina respecte al temps, corresponents a l'administració d'una dosi de 10 mg/kg per via i.v. a vedells es troben a la taula 6.

Taula 6. Paràmetres farmacocinètics de la tilosina després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a vedells.

<i>Paràmetres</i>	<i>Animal</i>							
	A	B	C	D	E	F	X	D.E.
AUC_0^t ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	312.5	585.4	318.1	374.4	333.5	350	378.9	103.6
AUC_0^{10h} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	312.5	489.9	318.1	374.4	333.5	350	363.1	66.1
MRT (min)	158.5	424.8	120.7	271.7	99.4	130.4	156.4*	125.4
$t_{1/2\beta}$ (min)	215.5	616.3	157.9	63.4	294.6	201.5	163.4*	191.1
Cl (mL/min/kg)	29.4	11.3	29.7	23.4	28.5	26.8	24.8	7.03
Vd_{area} (mL/kg)	6801.8	9368.9	6774.5	8958.7	6950.8	7790.8	7774.2	1146.2
Vd_{ss} (mL/kg)	4656.9	6576.6	3589.0	6348.1	2833.7	3492.7	4160.4	1570.5

* Mitjana harmònica

En l'administració per via i.v. s'observa una gran variabilitat entre els diferents animals tractats en relació amb els paràmetres AUC, MRT i $t_{1/2\beta}$.

A la taula 7 s'han expressat els valors de concentracions plasmàtiques obtingudes quan la tilosina es va administrar per via i.m. als 6 vedells objecte d'aquest estudi.

Taula 7. Concentracions plasmàtiques de la tilosina després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg a vedells.

<i>Temps (min)</i>	<i>Concentracions plasmàtiques ($\mu\text{g/mL}$)</i>						
	<i>Animal</i>						
	A	B	C	D	E	F	X\pmD.E
2	0.22	0.78	0.10	0.18	0.18	0.99	0.41 \pm 0.38
5	0.18	0.52	1.0	0.26	0.16	0.18	0.38 \pm 0.33
10	0.36	0.88	1.08	0.30	-	0.34	0.59 \pm 0.36
15	0.48	1.86	1.66	0.30	0.19	0.18	0.78 \pm 0.77
20	0.30	-	1.18	0.28	0.20	0.60	0.51 \pm 0.40
30	0.62	1.70	1.06	0.34	0.24	1.28	0.87 \pm 0.57
45	0.46	3.46	1.22	1.06	0.26	0.72	1.20 \pm 1.16
60	0.78	2.22	3.12	0.56	0.42	0.96	1.34 \pm 1.08
90	0.98	3.36	1.74	0.70	0.62	0.90	1.38 \pm 1.05
120	1.12	2.86	1.64	2.74	0.42	0.96	1.62 \pm 0.99
150	1.12	1.10	1.62	1.42	0.18	0.88	1.05 \pm 0.50
180	1.18	1.50	1.38	1.70	0.42	0.84	1.17 \pm 0.47
240	1.22	1.08	3.48	0.72	NQ	0.88	1.48 \pm 1.14
300	1.10	1.0	3.18	0.80	0.30	0.56	1.16 \pm 1.03
360	0.96	0.84	2.76	0.38	0.6	1.04	1.10 \pm 0.85
480	0.81	1.04	0.7	0.7	0.58	0.34	0.69 \pm 0.23
600	0.54	0.46	0.36	0.42	0.26	0.48	0.42 \pm 0.09
1440	NQ	0.30	0.16	NQ	0.16	0.28	0.22 \pm 0.09
2880	0.08	NQ	NQ	0.08	NQ	NQ	0.08

NQ: Nivells plasmàtics per sota del límit de quantificació.

A les figures 12 a 17 es representen les corbes de les concentracions plasmàtiques de la tilosina respecte al temps, després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg als 6 vedells tractats.

Figura 12. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell A després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.

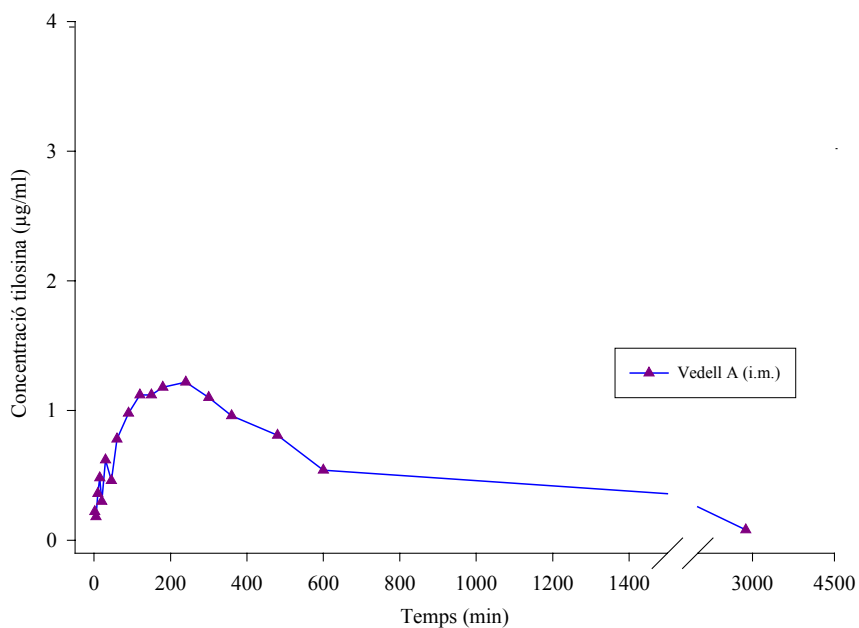


Figura 13. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell B després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.

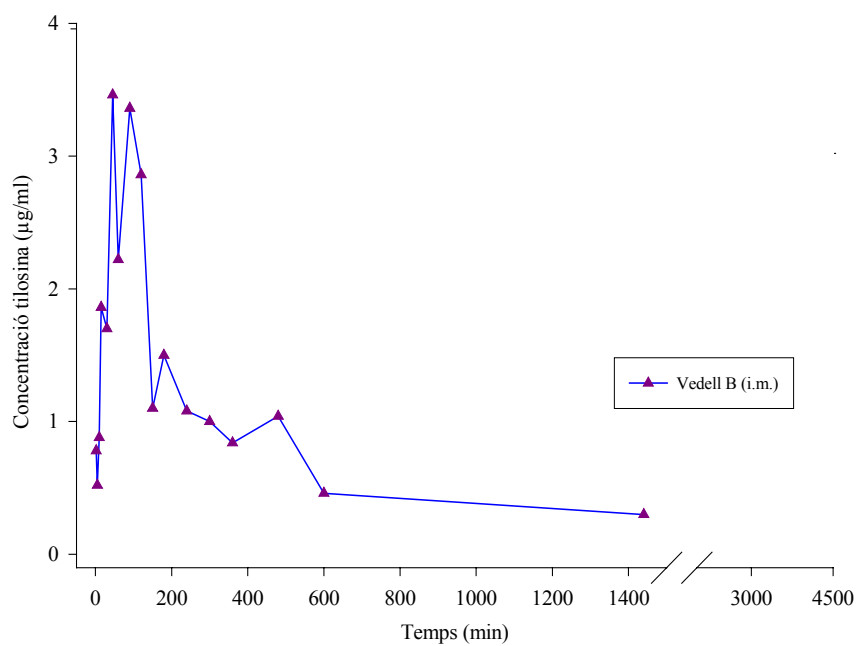


Figura 14. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell C després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.

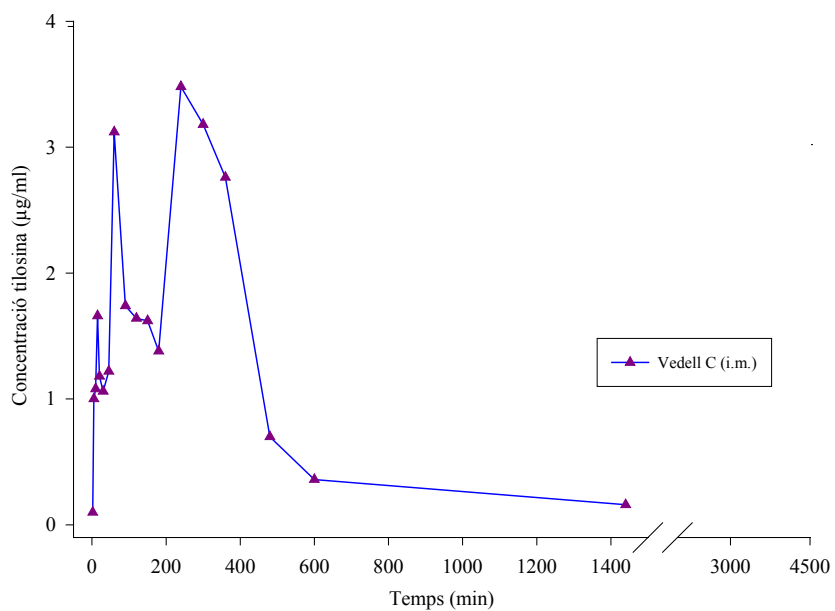


Figura 15. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell D després de l'administració per via im d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.

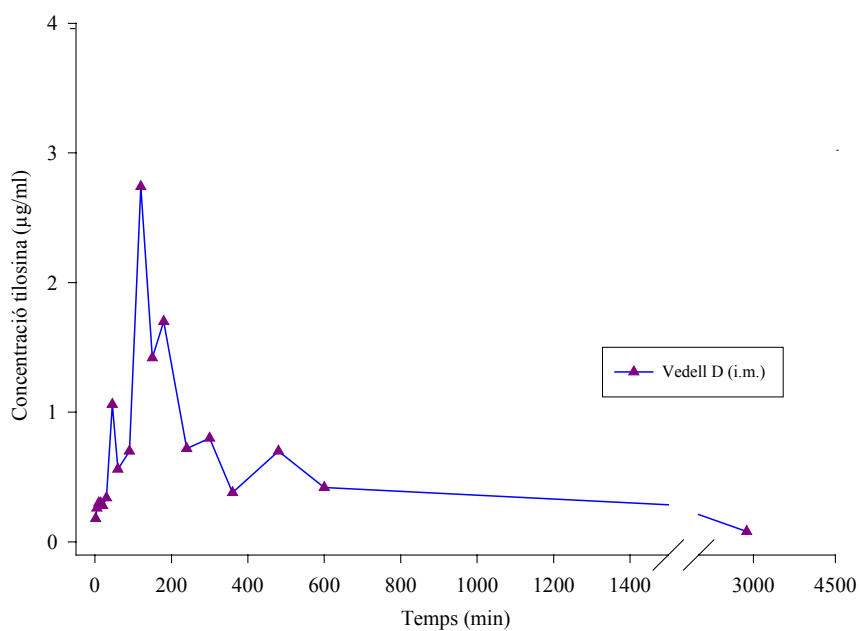


Figura 16. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell E després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.

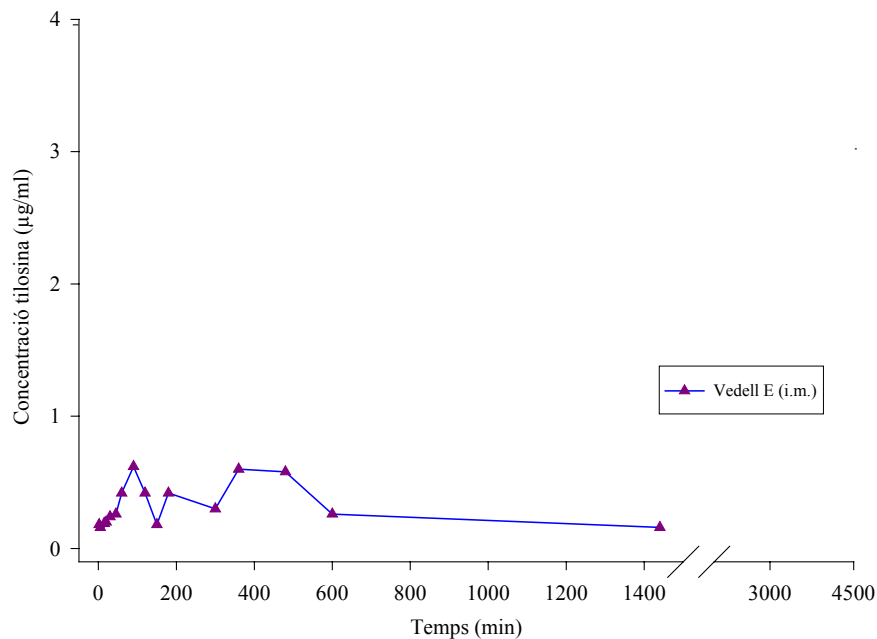
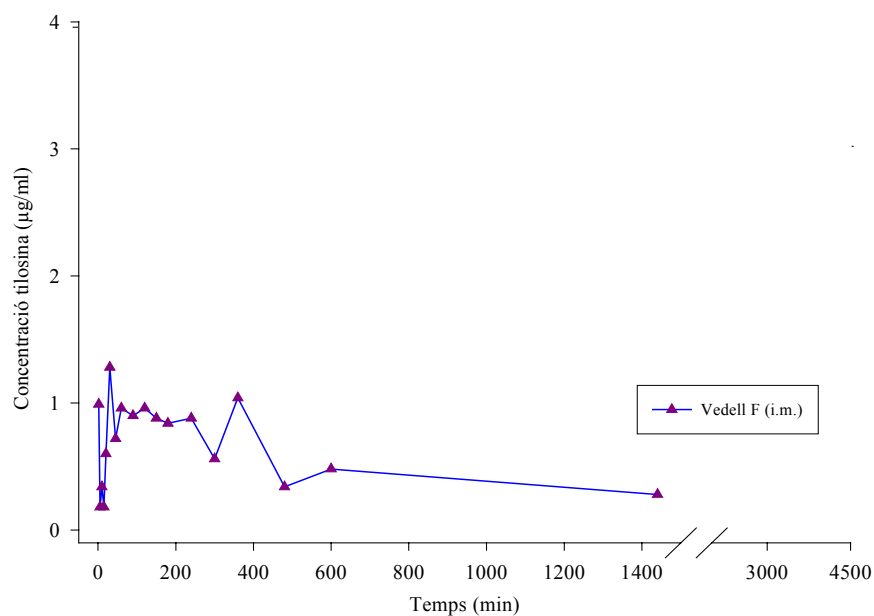


Figura 17. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el vedell F després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg.



Després de l'administració i.m. del fàrmac, s'observen concentracions plasmàtiques baixes de tilosina en tots els animals. La concentració màxima s'assoleix a les dues hores de l'administració del fàrmac, seguida d'un replà de nivells plasmàtics fins a les 6 hores postadministració, i se'n troben nivells detectables fins al segon dia posterior a la injecció del fàrmac. Els diferents animals presenten una alta variabilitat entre ells quant als nivells plasmàtics observats.

Els paràmetres farmacocinètics resultants de l'anàlisi matemàtica de les corbes de nivells plasmàtics de tilosina respecte al temps, corresponents a l'administració d'una dosi de 20 mg/kg per via i.m. a vedells es troben a la taula 8.

Taula 8. Paràmetres farmacocinètics de la tilosina després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg a vedells.

<i>Paràmetres</i>	<i>Animal</i>							
	A	B	C	D	E	F	X	D.E.
AUC_0^t ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	1251.6	1113.5	1312.7	1066.2	431.5	747.5	987.2	335.9
AUC_0^{10h} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	544.8	794.3	1094.3	496.2	255.1	428.3	520.5	298.1
MRT (min)	874.9	852.7	514.2	972.6	1582.1	1445.1	979.5*	400.3
$t_{1/2\beta}$ (min)	827.3	689.2	522.3	952.7	1198.8	1079.8	812.5*	250.6
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.2	3.5	3.1	2.7	0.6	1.3	2.1	1.2
t_{\max} (min)	240	45	90	120	90	30	102.5	74.9
MAT (min)	716.4	427.9	393.5	700.9	1482.7	1314.7	708.6	456.5
F (%)	87.2	81.1	172.0	66.3	38.2	61.2	73.7	46.2

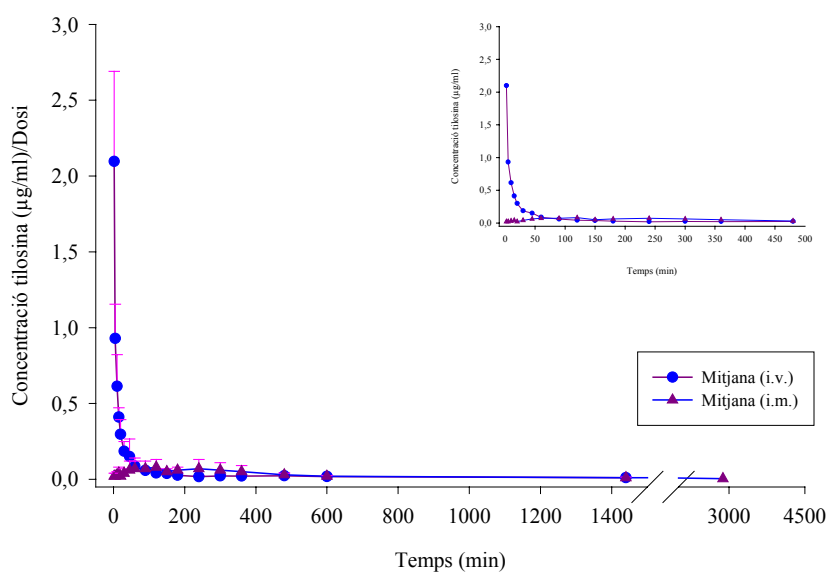
* Mitjana harmònica

En l'administració per via i.m. s'observa una gran variabilitat entre els diferents animals tractats en relació amb els paràmetres AUC, MRT, C_{\max} , i t_{\max} . Si es comparen els valors d'MRT i $t_{1/2\beta}$ en ambdues vies d'administració, es pot veure que aquests són superiors quan la via d'administració és la i.m..

El resultat mitjà obtingut de la relació entre les AUC_0^{10h} corresponents a ambdues vies d'administració, una vegada corregides per la dosi, dóna un valor de biodisponibilitat força alt però amb una gran variabilitat interindividual.

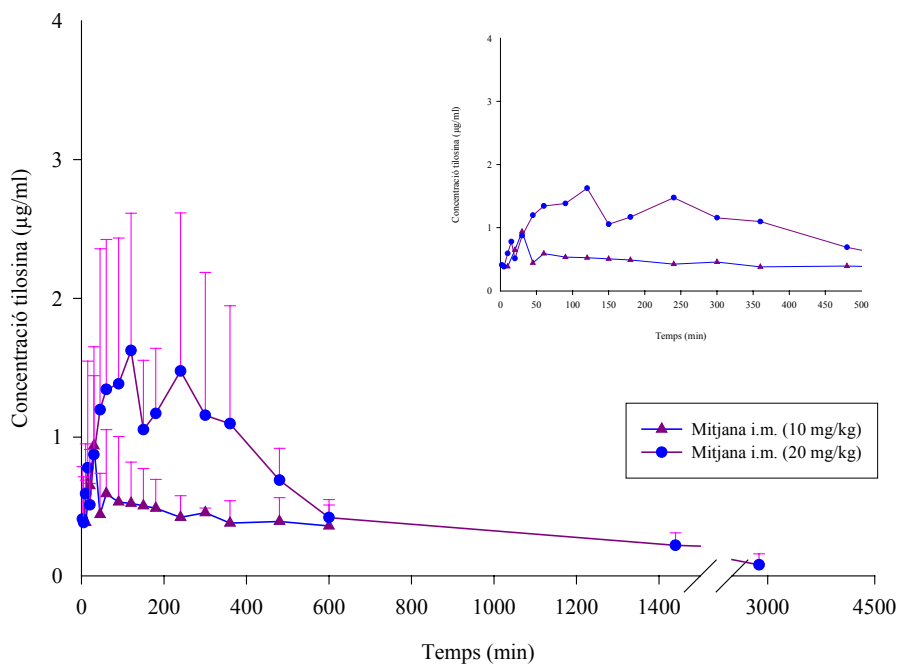
A la figura 18 es representen les corbes de nivells plasmàtics mitjans de tilosina, respecte al temps i corregits per la dosi (s'ha dividit cada concentració obtinguda per la dosi administrada per poder fer comparables ambdues administracions), corresponents a l'administració d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg per via i.m. i de 10 mg/kg per via i.v. als 6 vedells tractats.

Figura 18. Concentracions plasmàtiques mitjanes de tilosina, corregides per la dosi, després de l'administració de 10 i 20 mg/kg del fàrmac per via i.v. i i.m., respectivament, en vedells.



A la figura 19 es representen les corbes de nivells plasmàtics mitjans de la tilosina respecte al temps corresponents a l'administració d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg per via i.m. a 6 vedells i de 10 mg/kg als 4 vedells de l'estudi pilot.

Figura 19. Concentracions plasmàtiques mitjanes de tilosina en vedells després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 i 20 mg/kg.



Com es pot veure, existeix una alta variabilitat en ambdós grups. Els nivells plasmàtics de tilosina obtinguts després de l'administració de la dosi de 20 mg/kg equivalen aproximadament al doble dels observats amb la dosi de 10 mg/kg i les C_{max} s'obtenen una mica més tard en la dosi més alta.

4.1.1.3. Anàlisi estadística dels resultats

De l'anàlisi estadística dels paràmetres cinètics obtinguts en l'estudi del perfil cinètic de la tilosina en una dosi de 20 mg/kg per via i.m. i de 10 mg/kg per via i.v. es conclou que hi ha diferències significatives ($p < 0.05$) entre les dues vies d'administració per a l'MRT i el $t_{1/2\beta}$, però no s'han observat diferències per a l' AUC_0^t ni per l' AUC_0^{10h} . Com que la dosi administrada en aquest estudi fou diferent per a ambdues vies d'administració, el paràmetre AUC va ser corregit per la dosi per fer equivalents les diferents administracions, previament a l'anàlisi estadística.

4.1.1.4. Càlcul de l'eficàcia terapèutica per als diferents microorganismes causants de malalties en vedells

A la taula 9 es mostren els valors dels diferents índexs d'eficàcia corresponents a l'administració de tilosina en una dosi de 20 mg/kg per via i.m. per a cadascú dels microorganismes causants de les malalties de més interès en aquesta espècie.

Taula 9. Resultats del càlcul dels índexs d'eficàcia de la tilosina administrada en una dosi de 20 mg/kg en vedells per als diferents agents etiològics.

<i>Microorganisme</i>	<i>Paràmetres</i>		
	C_{max}/CMI_{50}	AUC_{0-24h}/CMI_{50}	T>CMI ₅₀ (%)
<i>Mycoplasma bovis</i>	21.6	8792	50
<i>Corynebacterium .pyogenes</i>	5.25	2132	58.3
<i>Moraxella bovis</i>	26.25	2132	58.3
<i>Fusobacterium. necrophorum</i>	1.34	546.7	2
<i>Pasteurella</i>	0.03	13.3	0
<i>Bordetella</i>	0.01	4.3	0
<i>Staphylococcus</i>	2.1	804	10.9
<i>Streptococcus</i>	2.1	853	10.9

* Es varen considerar eficaços els paràmetres $C_{max}/CMI > 10$; $AUC_{0-24h}/CMI > 125$; T>CMI (%) = 50 d'acord amb (Gunderson i cols., 2001; Sánchez, 2000).

Com es pot veure a la taula, hi ha diferències en els resultats segons l'índex utilitzat, en què el paràmetre AUC_{0-24h} / CMI és l'indicador d'eficàcia més permissiu i el $T > CMI$, el més estricte, tot i que el paràmetre més significatiu per als fàrmacs tempsdependents és el $T > CMI$.

4.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs

4.1.2.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina administrada per via i.v. i i.m.

A la taula 10 es mostren les concentracions plasmàtiques de tilosina observades després d'administrar una dosi de fàrmac de 10 mg/kg per via i.v. als 6 porcs objecte d'aquest estudi.

Taula 10. Concentracions plasmàtiques de tilosina després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs.

Temps (min)	Concentracions plasmàtiques ($\mu\text{g/mL}$)						X \pm D.E.
	Animal						
	A	B	C	D	E	F	
2	-	7	11.6	11.88	7.4	10.21	9.62 \pm 2.30
5	-	2.78	7.65	6.33	-	6.22	5.75 \pm 2.08
10	6.25	2.38	3	4.53	3.3	3.89	3.89 \pm 1.37
15	3.8	2.04	2.09	2.55	2.44	1.95	2.48 \pm 0.69
20	2.95	1.22	1.75	-	0.99	1.91	1.76 \pm 0.76
30	2.39	1.01	1.14	-	0.88	1.05	1.29 \pm 0.62
45	1.57	1	1.06	0.59	0.43	0.77	0.90 \pm 0.40
60	1.04	0.67	0.79	0.22	0.68	0.49	0.65 \pm 0.28
90	0.54	0.28	0.51	0.65	0.45	0.19	0.44 \pm 0.17
120	0.49	0.19	0.31	0.28	0.3	0.12	0.28 \pm 0.13
150	0.58	0.16	0.1	0.4	0.32	0.08	0.27 \pm 0.20
180	0.44	0.14	0.12	0.3	0.38	NQ	0.28 \pm 0.14
240	0.18	0.05	NQ	0.29	0.27	NQ	0.20 \pm 0.11
300	0.3	0.1	NQ	0.25	NQ	NQ	0.22 \pm 0.10
360	0.18	0.09	0.18	NQ	0.18	NQ	0.16 \pm 0.04
480	0.18	NQ	NQ	0.15	0.15	NQ	0.16 \pm 0.02
600	0.28	NQ	0.39	0.32	0.33	NQ	0.33 \pm 0.05
840	NQ	0.1	0.27	0.09	NQ	NQ	0.15 \pm 0.10
1440	0.32	NQ	0.14	0.19	0.31	NQ	0.24 \pm 0.09
2160	NQ	NQ	0.43	0.11	0.17	0.14	0.21 \pm 0.15
2880	NQ	0.36	0.15	NQ	0.14	NQ	0.22 \pm 0.12
4320	NQ	NQ	NQ	0.16	NQ	0.22	0.19 \pm 0.04

NQ: Nivells plasmàtics per sota dels límits de quantificació.

A les figures 20 a la 25 es poden veure representades les corbes de les concentracions plasmàtiques de tilosina respecte al temps, després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs.

Figura 20. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc A després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

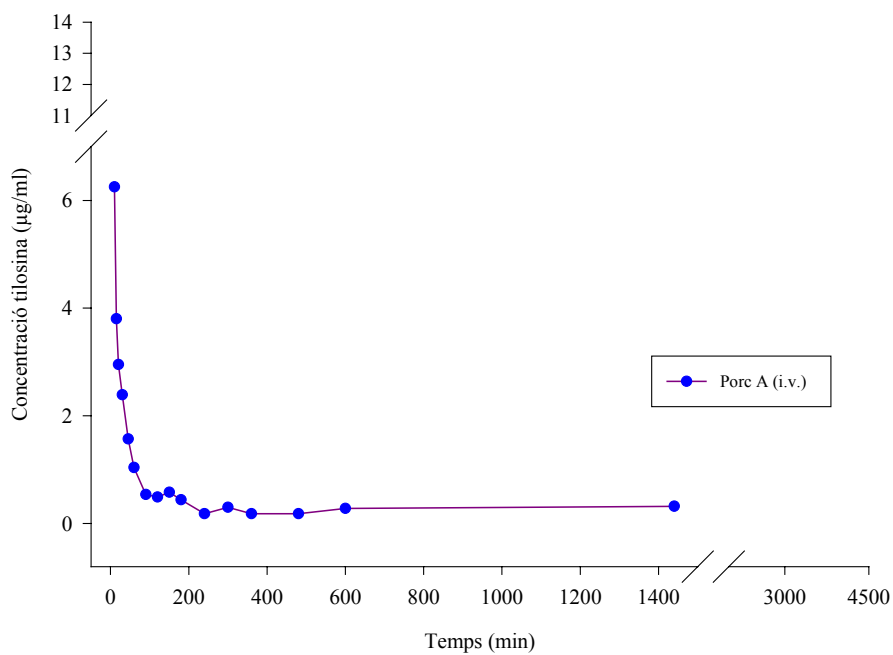


Figura 21. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc B després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

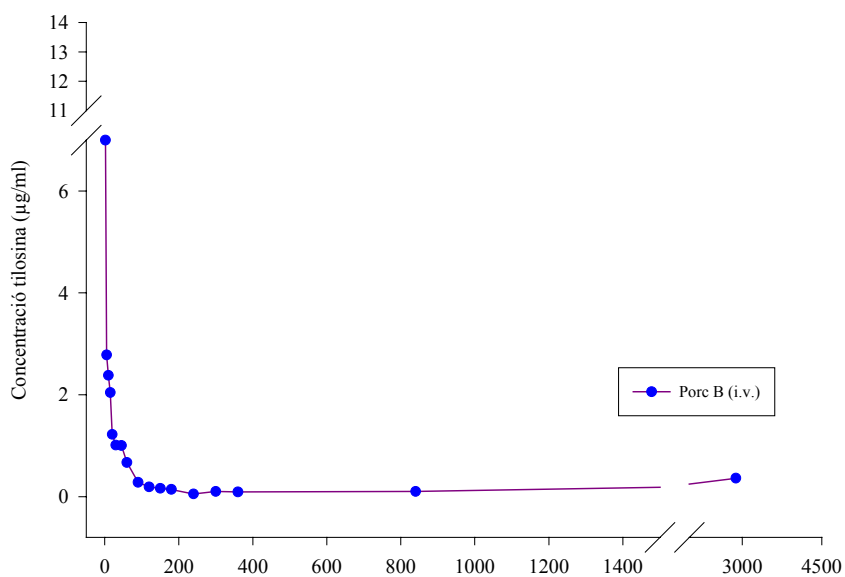


Figura 22. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc C després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

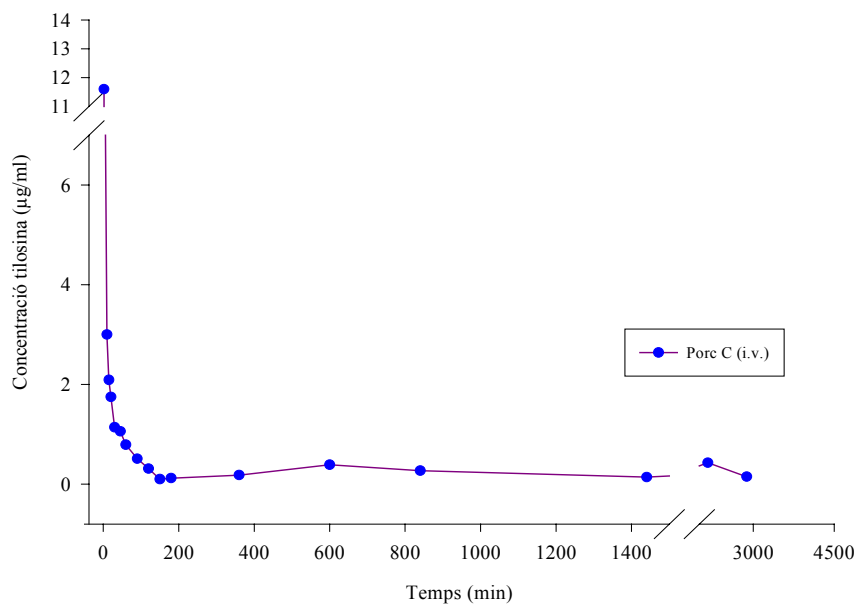


Figura 23. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc D després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

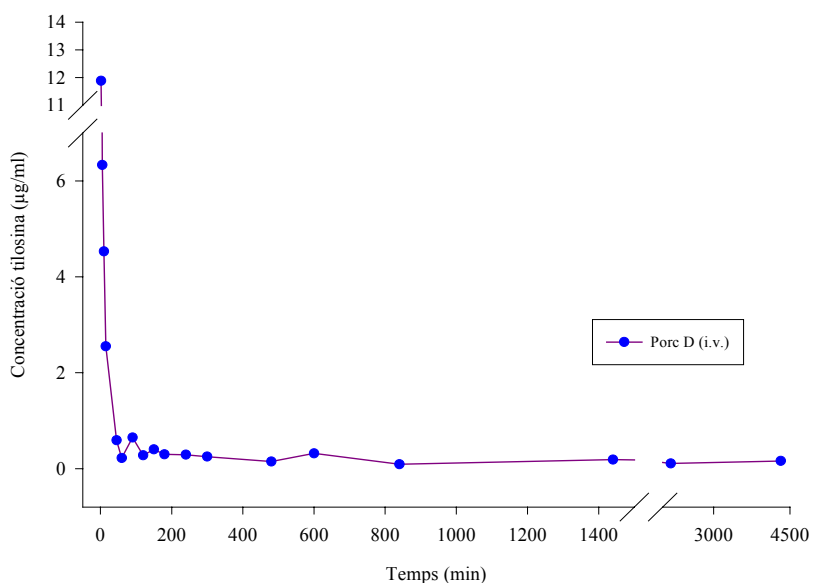


Figura 24. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc E després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

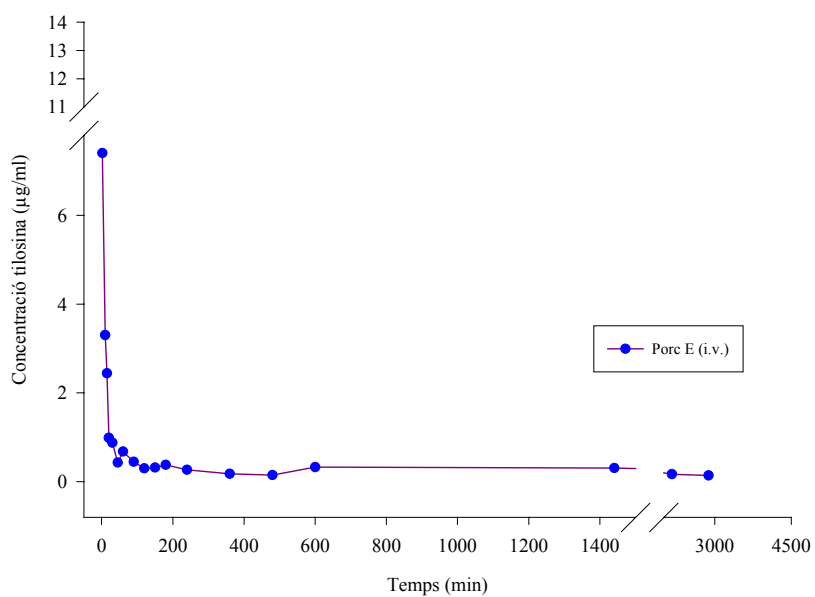
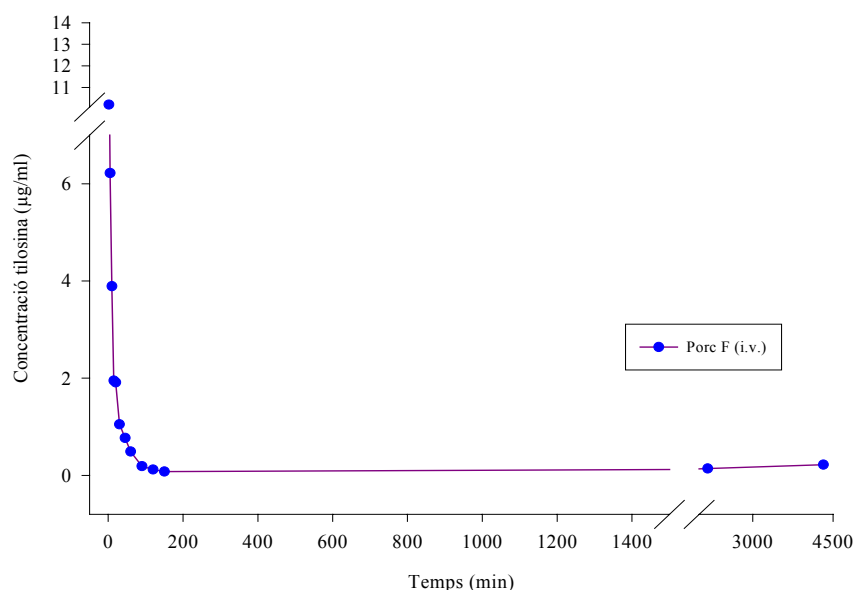


Figura 25. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc F després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.



Les concentracions plasmàtiques respecte al temps, expressades a la taula 10 i representades a les figures, mostren que després de l'administració del fàrmac per via i.v., les concentracions plasmàtiques disminueixen ràpidament durant la primera hora. A partir de la segona hora, les concentracions es mantenen amb petites oscil·lacions fins a la cinquena hora postadministració. A continuació, les concentracions disminueixen lentament, tot i que se'n poden trobar encara detectables al tercer dia postadministració.

A la taula 11 es mostren els paràmetres farmacocinètics resultants de l'anàlisi matemàtica de les corbes de nivells plasmàtics respecte al temps, corresponents a l'administració i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs. L'animal F no es va tenir en compte per al càlcul de la mitjana perquè

presentava paràmetres farmacocinètics molt discrepants de la resta dels animals.

Taula 11. Paràmetres farmacocinètics de la tilosina en porcs, després de l'administració per via i.v. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

<i>Paràmetres</i>	<i>Animal</i>							
	A	B	C	D	E	F*	X	D.E.
AUC₀^t (µg·min/mL)	582.6	656.2	922.7	817.3	322.1	367.3	660.2	231.3
MRT (min)	178.5	201.1	420.0	380.0	243.5	31.4	253.9*	108.8
t_{1/2β} (min)	176.6	272.1	471.7	396.1	224.8	51.3	271.3*	122.5
Cl (mL/min/kg)	26.8	56.0	24.7	25.5	36.9	65.02	34.0	13.3
Vd_{area} (mL/kg)	6822	22001	16842	14560	11963	4809.9	14437	5637.4
Vd_{ss} (mL/kg)	4778	11268	10390	9681.4	8980.2	2041.2	9019.5	2518.1

*Animal no considerat en el càlcul de la mitjana.

• Mitjana harmònica

En referència als paràmetres obtinguts després de l'administració per via i.v., es pot observar una alta variabilitat entre els diferents animals tractats pel que fa als paràmetres t_{1/2β} i de MRT .

A la taula 12 es mostren les concentracions plasmàtiques de tilosina observades després d'administrar una dosi de fàrmac de 10 mg/kg per via i.m. als 6 porcs objecte d'aquest estudi.

Taula 12. Concentracions plasmàtiques de tilosina després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs.

<i>Temps (min)</i>	<i>Concentracions plasmàtiques (µg/mL)</i>						
	Animal						X±D.E.
	A	B	C	D	E	F	
2	NQ	-	NQ	0.21	0.18	0.18	0.19±0.02
5	0.18	0.38	NQ	0.28	0.21	0.2	0.25±0.08
10	0.26	0.18	0.22	0.44	0.14	0.24	0.25±0.10
15	0.19	0.22	-	0.4	0.16	0.24	0.24±0.09
20	0.37	0.96	0.38	0.49	0.16	0.24	0.43±0.28
30	0.62	0.34	0.42	0.74	0.18	0.35	0.44±0.20
45	0.56	0.52	0.36	0.77	0.24	0.72	0.53±0.20
60	0.56	0.42	0.3	0.83	0.18	0.34	0.44±0.23
90	0.74	0.7	0.4	0.86	0.36	0.56	0.60±0.20
120	0.8	0.7	0.32	1.31	0.24	0.4	0.63±0.40
150	0.6	0.79	0.32	0.81	0.22	0.5	0.54±0.24
180	1.92	0.85	0.3	1.24	0.22	0.48	0.84±0.65
240	1.12	-	0.3	0.81	0.26	0.3	0.56±0.39
300	0.56	0.61	0.3	0.84	0.14	0.32	0.46±0.25
360	0.3	0.58	0.24	0.45	0.26	0.32	0.36±0.13
480	0.28	0.13	0.34	0.14	0.21	0.24	0.22±0.08
600	0.32	0.22	0.28	0.37	0.2	0.32	0.29±0.07
840	0.36	0.26	0.27	0.4	0.16	0.08	0.25±0.12
1440	NQ	NQ	0.34	0.11	NQ	NQ	0.22±0.16
2160	0.18	0.11	0.3	0.11	NQ	NQ	0.17±0.09
2880	NQ	0.14	0.27	0.11	NQ	NQ	0.17±0.08
4320	0.09	0.14	NQ	0.15	NQ	NQ	0.13±0.03

NQ: Nivells plasmàtics per sota del límit de quantificació.

A les figures 26 a 31 es poden veure representades les corbes de les concentracions plasmàtiques de tilosina respecte al temps, després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg als 6 porcs objecte d'aquest estudi.

Figura 26. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc A després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

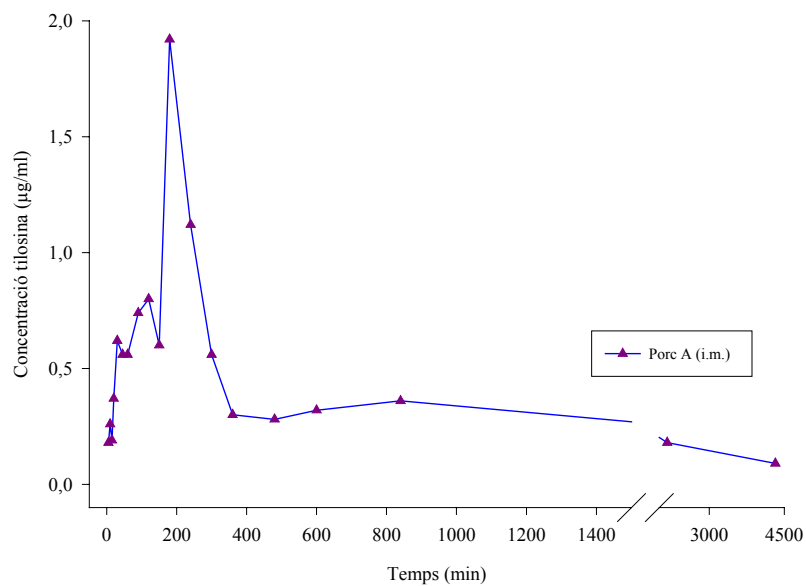


Figura 27. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc B després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

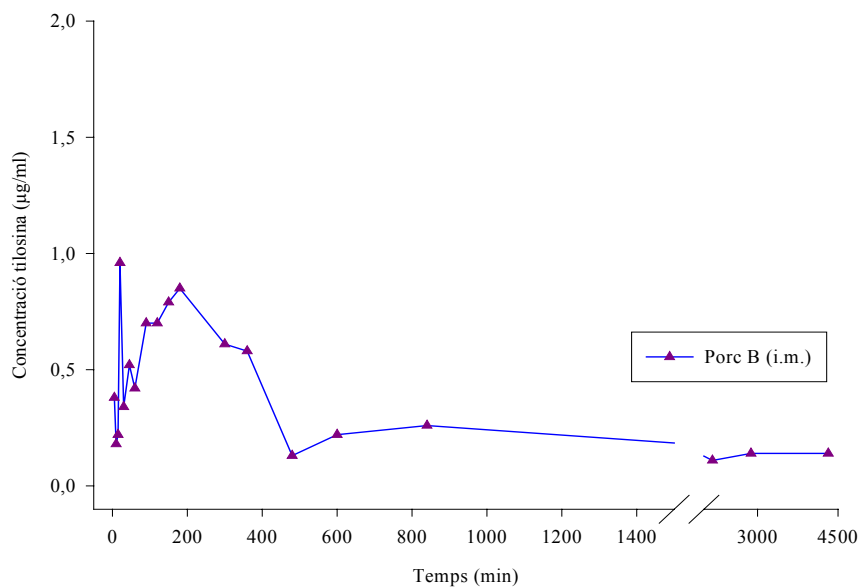


Figura 28. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc C després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

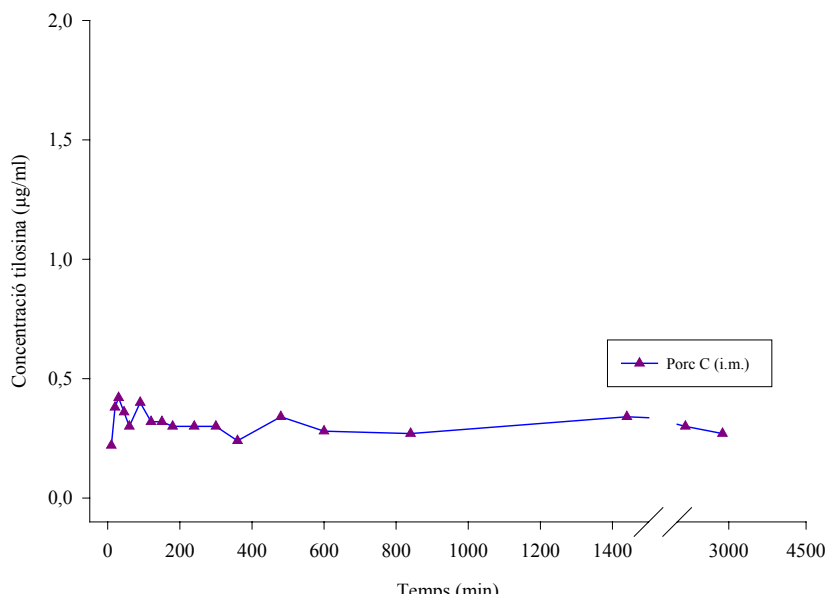


Figura 29. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc D després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

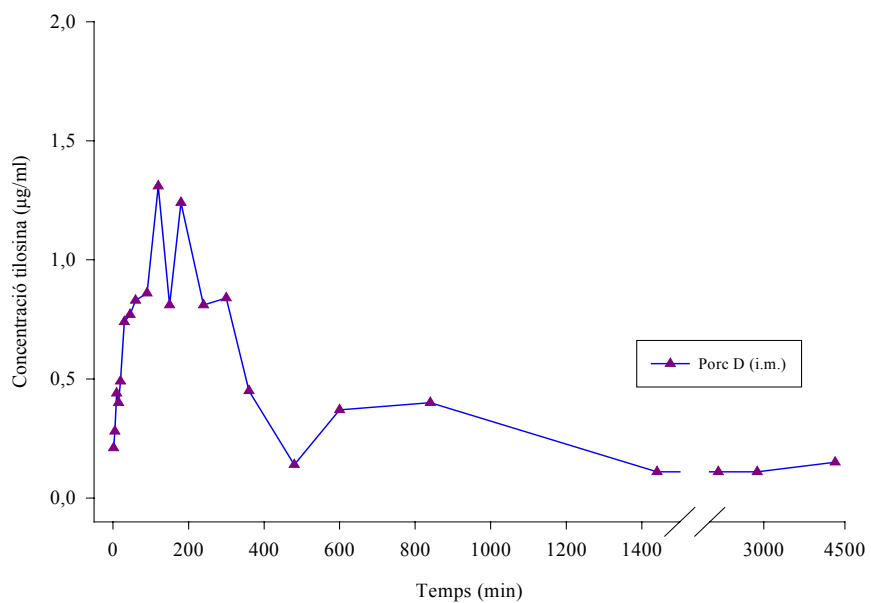


Figura 30. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc E després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

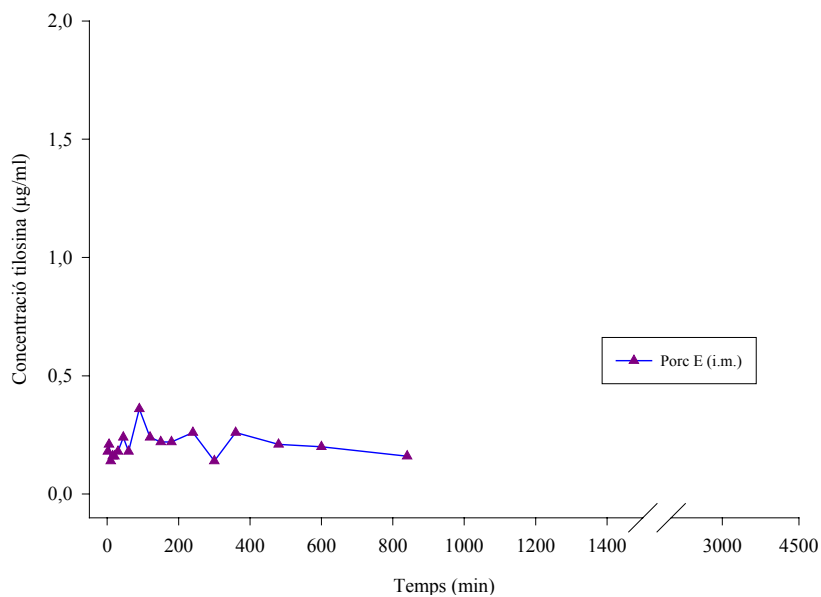
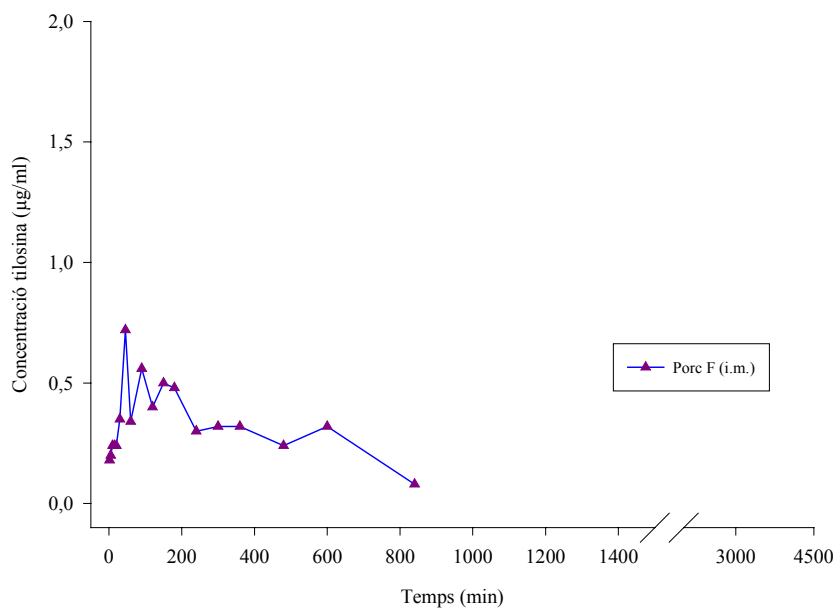


Figura 31. Concentracions plasmàtiques de tilosina en el porc F després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.



Després de l'administració i.m. del fàrmac, s'observa que la tilosina s'absorbeix lentament i de manera sostinguda durant les primeres 3 hores, i encara es troben nivells detectables als 3 dies postadministració.

A la taula 13 es mostren els paràmetres farmacocinètics resultants de l'anàlisi matemàtica de les corbes de nivells plasmàtics respecte al temps, corresponents a l'administració i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs. L'animal F no es va tenir en compte per al càlcul de la mitjana perquè va presentar paràmetres farmacocinètics molt discrepants de la resta dels animals.

Taula 13. Paràmetres farmacocinètics de tilosina en porcs, després de l'administració per via i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.

Paràmetres	Animal							
	A	B	C	D	E	F*	X	D.E.
AUC ₀ ^t	609.5	689.8	867.9	776.5	176.2	255.7	624.0	268.2
MRT (min)	2283.6	1263.6	2898.7	1629.1	2322.9	492.9	1909.4 [•]	640.4
t _{1/2β} (min)	1773.1	1063.2	1983.6	1270.5	1646.7	377.7	1469.3 [•]	374.9
C _{max} (µg/mL)	1.9	1	0.4	1.3	0.4	0.7	1.0	0.6
t _{max} (min)	180	20	30	120	90	45	88.0	66.1
F (%)	104.6	105.1	94.1	95	54.7	69.6	90.7	20.8
MAT (min)	2105.1	1062.5	2478.7	1249.1	2079.4	461.5	1794.9	608.1

* Animal no considerat en el càlcul de la mitjana.

• Mitjana harmònica

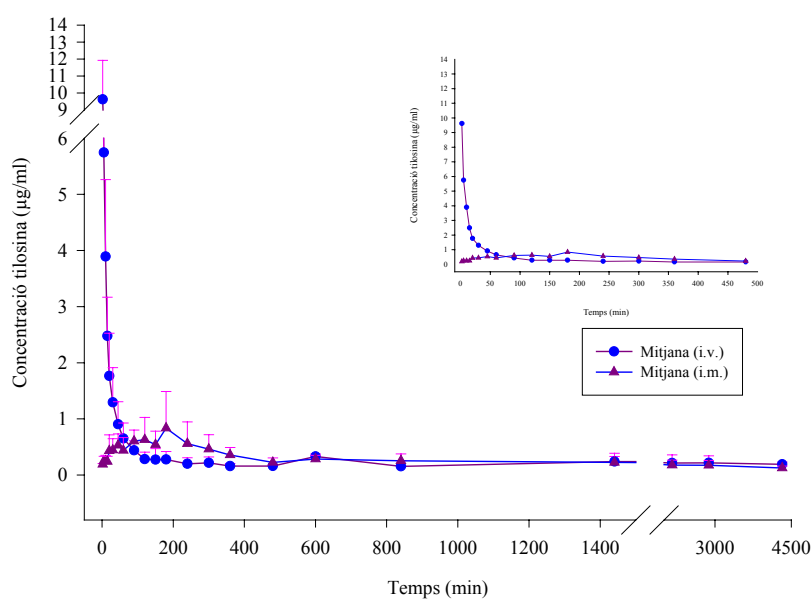
En referència als paràmetres obtinguts després de l'administració per via i.m., es pot observar una alta variabilitat entre els diferents animals tractats pel que fa als paràmetres t_{max} i C_{max}.

Els valors de t_{1/2β} i d'MRT són més alts després de l'administració per via i.m. en comparació amb els obtinguts quan la tilosina s'administrà per via i.v..

Els valors d'AUC en ambdues vies d'administració són molt similars, la qual cosa es tradueix en una alta biodisponibilitat.

A la figura 32 es pot veure la representació gràfica de les corbes de nivells plasmàtics mitjans de tilosina respecte al temps, després de l'administració per via i.v. i i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg a porcs.

Figura 32. Concentracions plasmàtiques mitjanes de tilosina en porcs després de l'administració per via i.v. i i.m. d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg.



4.1.2.2. Anàlisi estadística dels resultats

En comparar estadísticament els paràmetres obtinguts després d'ambdues administracions s'ha pogut observar que hi ha diferències significatives ($p < 0.05$) entre les dues vies d'administració per a l'MRT i per al $t_{1/2\beta}$, però no s'observaren diferències per a l'AUC.

4.1.2.3. Càlcul de l'eficàcia terapèutica per als diferents microorganismes causants de malalties en porcs

A la taula 14 es mostren els valors dels diferents índexs d'eficàcia corresponents a l'administració de tilosina en una dosi de 10 mg/kg per via i.m. envers cadascun dels microorganismes causants de les malalties de més interès en aquesta espècie.

Taula 14. Resultats del càlcul dels índexs d'eficàcia de la tilosina administrada en una dosi de 10 mg/kg en porcs per als diferents agents etiològics.

<i>Microorganisme</i>	<i>Paràmetres</i>		
	C_{\max}/CMI	$\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI}$	T>CMI (%)
<i>Erysipelothrix. rhusiopathiae</i>	10	4400	100
<i>Mycoplasma</i>	10	4400	100
<i>Staphylococcus</i>	0.94	415	0
<i>Streptococcus</i>	2.5	1100	64.8
<i>Corynebacterium</i>	2.5	1100	64.8
<i>Fusobacterium</i>	0.64	282	0
<i>Vibrio</i>	0.5	88	0
<i>Pasteurella*</i>	0.07	34	0
<i>Bordetella *</i>	0.005	2.2	0

* Es consideren eficaços els paràmetres $C_{\max}/\text{MIC}>10$; $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{MIC}>125$; T>MIC (%) = 50 d'acord amb (Gunderson i cols., 2001; Sánchez, 2000).

Els valors de CMI emprats corresponen a CMI_{50} , excepte pels bacteris amb * que són valors de CMI_{90} .

Com es pot veure als resultats de la taula, hi ha diferències en els resultats segons l'índex utilitzat; el paràmetre $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{CMI}$ és l'indicador d'eficàcia més permissiu (indica que la tilosina seria eficaç per a la major part del microorganismes), mentre que els C_{\max}/CMI i T>CMI serien els més estrictes, tot i que el paràmetre més significatiu per als fàrmacs tempsdependents és el T>CMI.

4.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ PER VIA INTRAMUSCULAR

4.2.1. Estudi de la depleció de residus de tilosina en vedells

A les taules 15 a 19 es poden veure les concentracions de tilosina obtingudes en cadascun dels teixits diana, després de tractar 12 animals per via i.m. amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg cada 24 h durant 5 dies i de sacrificar-los a diferents temps postadministració (7, 14 i 21 dies). L'LMR establert per a tots els teixits de bovins correspon a 100 µg/kg.

Taula 15. Concentracions de tilosina en múscul de vedelles tractades durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificades als 7, 14 i 21 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en múscul (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
7 (1)	<50	<50	<50	<50
14 (2)	<50	<50	<50	<50
21 (3)	<50	<50	<50	<50

Taula 16. Concentracions de tilosina en fetge de vedelles tractades durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificades als 7, 14 i 21 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en fetge (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
7 (1)	<50	<50	<50	<50
14 (2)	<50	<50	<50	<50
21 (3)	<50	<50	<50	<50

Taula 17. Concentracions de tilosina en ronyó de vedelles tractades durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificades als 7, 14 i 21 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en ronyó (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
7 (1)	142	108	126	116
14 (2)	<50	<50	<50	<50
21 (3)	<50	<50	<50	<50

Taula 18. Concentracions de tilosina en greix de vedelles tractades durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificades als 7, 14 i 21 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en greix (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
7 (1)	<50	<50	<50	<50
14 (2)	<50	<50	<50	<50
21 (3)	<50	<50	<50	<50

Taula 19. Concentracions de tilosina en el punt d'injecció de vedelles tractades durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificades als 7, 14 i 21 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en el punt d'injecció (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
7 (1)	2700	7200	5900	1500
14 (2)	1700	2000	1500	2100
21 (3)	<50	570	2310	440

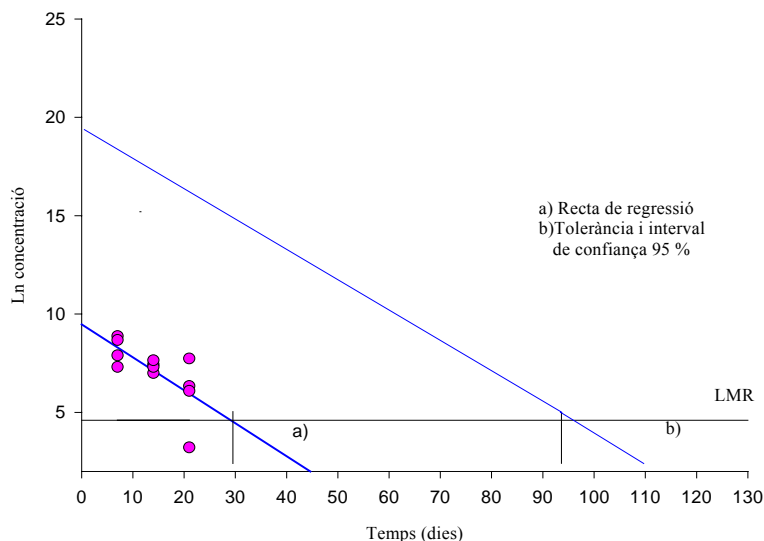
Com es pot observar a les taules, en tots els teixits els nivells observats es van trobar per sota del límit de quantificació des del primer període de sacrifici, excepte pel que fa al ronyó, teixit en què es van detectar nivells de tilosina per sobre de l'LMR al setè dia postadministració i al punt d'injecció, on es troben nivells superiors a l'LMR fins als 21 dies postadministració.

4.2.1.1. Càlcul del temps d'espera

En fer la corba de depleció de l'únic teixit on es troben concentracions quantificables en els tres períodes de sacrifici (punt d'injecció), s'observa que els temps fixats eren insuficients per a definir bé la depleció de la tilosina d'aquest teixit ja que en totes les mostres, les concentracions de fàrmac es trobaven per sobre de l'LMR. No obstant això, a partir de les dades obtingudes es va calcular el temps d'espera mitjançant el programa estadístic en el qual es van introduir les dades obtingudes al punt d'injecció dels vedells sacrificats als 7, 14 i 21 dies. El resultat del temps d'espera amb un límit de tolerància i un interval de confiança del 95 % seria igual a 92.5 dies

A la figura 33 es pot veure la corba de depleció de residus de tilosina al punt d'injecció de vedells, després de l'administració d'una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m., durant 5 dies.

Figura 33. Corba de depleció de residus de tilosina del punt d'injecció de vedells, als quals se'ls ha administrat una dosi de fàrmac de 20 mg/kg/dia per via i.m. durant 5 dies.



Si s'aplica l'aproximació recomanada per la guia (marge de seguretat d'un 30 %), sobre el període de sacrifici en el que totes les concentracions tisulars de tilosina es troben per sota de l'LMR (14 dies), el resultat del temps d'espera seria de 18 dies.

4.2.2. Estudi de la depleció de residus de tilosina en porcs

A les taules 20 a 24 es poden veure les concentracions de tilosina obtingudes després d'analitzar els teixits diana provinents dels 16 porcs tractats per via i.m. amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia cada 24 h durant 5 dies consecutius i de sacrificar-los a diferents temps postadministració. L'LMR establert per a tots els teixits de porc és de 100 µg/kg.

Taula 20. Concentracions de tilosina en múscul de porcs tractats durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificats als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en múscul (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
3 (1)	50	60	<50	<50
7 (2)	<50	100	<50	<50
10 (3)	<50	<50	<50	<50
14 (4)	<50	<50	<50	<50

Taula 21. Concentracions de tilosina en fetge de porcs tractats durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificats als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en fetge (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
3 (1)	70	80	<50	80
7 (2)	<50	<50	<50	<50
10 (3)	<50	<50	<50	<50
14 (4)	<50	<50	<50	<50

Taula 22. Concentracions de tilosina en ronyó de porcs tractats durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificats als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en ronyó (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
3 (1)	120	<50	<50	<50
7 (2)	<50	110	70	<50
10 (3)	<50	<50	<50	<50
14 (4)	<50	<50	<50	<50

Taula 23. Concentracions de tilosina en pell+greix de porcs tractats durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificats als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en pell+greix (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
3 (1)	84	101	66	78
7 (2)	460	<50	56	<50
10 (3)	<50	<50	<50	<50
14 (4)	<50	<50	<50	<50

Taula 24. Concentracions de tilosina en el punt d'injecció de porcs tractats durant 5 dies consecutius amb una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. i sacrificats als 3, 7, 10 i 14 dies postadministració.

<i>Sacrifici (dies)</i> (Grup)	<i>Concentració de tilosina en el punt d'injecció (µg/kg)</i>			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
3 (1)	440	110	1260	2540
7 (2)	120	310	100	4100
10 (3)	<50	<50	<50	<50
14 (4)	<50	<50	<50	<50

Com es pot observar a les taules, gairebé en tots els períodes de sacrifici i per a la majoria de teixits els nivells de fàrmac es troben per sota del límit de quantificació, excepte en el cas de la pell+greix i del punt d'injecció on

els nivells de fàrmac es mantenen per sobre de l'LMR fins al setè dia postadministració.

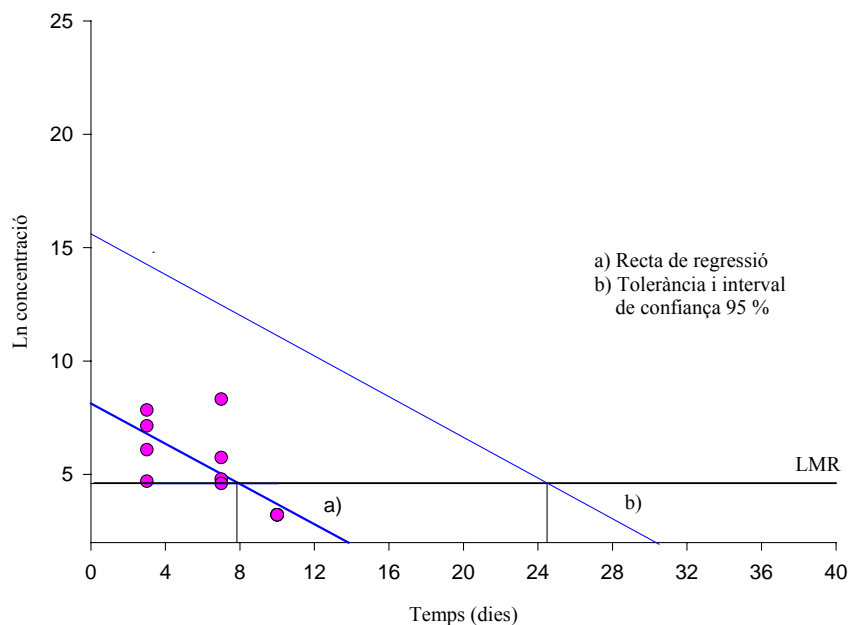
4.2.2.1. Càlcul del temps d'espera

El càlcul del temps d'espera en els porcs tractats amb tilosina a la dosi assajada dona com a resultat un temps d'espera de 13 dies, resultat d'aplicar el 30% de marge de seguretat (l'EMEA recomana una aproximació amb l'aplicació d'un marge de seguretat entre un 10 i un 30 %) sobre el període de sacrifici en què tots els teixits tenen concentracions per sota de l'LMR.

Si es calcula el temps d'espera mitjançant el programa estadístic al qual s'han introduït les dades obtingudes al punt d'injecció dels porcs sacrificats als 3, 7 i 10 dies; considerant els valors d'aquest últim període com la meitat del límit de quantificació, és a dir 25 µg/kg (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996); el resultat és un temps d'espera amb un límit de tolerància i un interval de confiança del 95 % igual a 24.4 dies.

A la figura 34 es pot veure la corba de depleció de residus de tilosina en el punt d'injecció de porcs, després de l'administració d'una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m., durant 5 dies.

Figura 34. Corba de depleció de residus de tilosina del punt d'injecció de porcs, als quals se'ls ha administrat una dosi de fàrmac de 10 mg/kg/dia per via i.m. durant 5 dies.



V. DISCUSSION

5.1. ESTUDI DEL PERFIL CINÈTIC DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ INTRAVENOSA I INTRAMUSCULAR A VEDELLS I A PORCS.

5.1.1. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en vedells

Després de portar a terme un estudi pilot per veure quins eren els nivells plasmàtics que s'obtenien després d'administrar la tilosina per via i.m., en una dosi de 10 mg/kg a 4 vedells, els resultats obtinguts van posar de relleu que aquests eren significativament baixos en comparació amb les concentracions efectives (CMI) per a molts dels microorganismes patògens per a la espècie estudiada. Aquestes baixes concentracions plasmàtiques poden estar relacionades amb diferents factors; així, és conegut l'efecte irritant de la tilosina en la zona d'injecció (Gueorguieva i cols., 1998), cosa que pot facilitar l'enquistament del fàrmac en aquest lloc, i alentir-ne l'absorció de manera significativa. Tampoc no es pot oblidar que es tracta d'un fàrmac molt liposoluble que es distribueix ràpidament i extensivament per l'organisme i que assoleix altes concentracions en teixits molt perifèrics, com per exemple la pell, o bé s'acumula als macròfags (Chamberland, 2001, comunicació personal). A més, és també conegut que la tilosina s'elimina ràpidament de l'organisme i que presenta uns temps de semivida relativament curts. Aquests factors poden donar lloc a una desaparició ràpida del fàrmac de la sang, i per tant, aquest fet produeix que els nivells plasmàtics no sigui el paràmetre més adient per avaluar l'efectivitat.

En l'administració i.m. del fàrmac en una dosi de 10 mg/kg és va assolir la C_{\max} (de la mitjana de les concentracions) als 30 min de ser administrat, seguidament, els nivells varen disminuir fins a concentracions de 0.36 µg/mL a les 10 h postadministració. La C_{\max} obtinguda en aquest estudi fou lleugerament superior a l'observada per Saurit i cols, (2002) en un estudi realitzat en vaques i búfals en el qual es va administrar la mateixa dosi de tartrat de tilosina, i on la C_{\max} va ser de 0.65 µg/mL, el t_{\max} de 63 min, i l'AUC de l'ordre de 6 vegades superior a l'observada en l'estudi que ens ocupa.

Aquestes dades varen suggerir l'interès de treballar amb una dosi superior de tilosina ja que la dosi administrada de 10 mg/kg per via i.m. donava nivells plasmàtics baixos que feien pensar en la possibilitat que el fàrmac no assolís nivells terapèutics en els teixits infectats. L'MRT observat va presentar valors entorn a les 20 hores, cosa que suggeria que era necessari fer un mostreig superior a les 48 hores per definir correctament la fase d'eliminació quan s'administrés una dosi dues vegades superior (20 mg/kg). Així, aquest estudi preliminar va permetre fixar la idoneïtat d'administrar una dosi de 20 mg/kg per a l'estudi del perfil cinètic de la tilosina i de la seva biodisponibilitat en ésser administrada per via i.m.. Aquesta anàlisi preliminar del perfil de la tilosina (paràmetres cinètics calculats) administrada per via i.m. (10 mg/kg) també va permetre definir amb més precisió el temps de mostreig per a fer l'estudi posterior.

D'aquesta manera, es va fixar el protocol del segon estudi que es va portar a terme amb 6 vedells als quals se'ls va sotmetre a dos tractaments consecutius amb el fàrmac, un per via i.v. (10 mg/kg) i un altre per via i.m. (20 mg/kg), de manera creuada. Per a l'administració i.v. es va escollir una

dosi igual a la meitat de la que s'administrava per via i.m. ja que els alts nivells plasmàtics que s'obtenien en administrar la tilosina per via i.v. podien produir reaccions adverses en els animals tractats.

En el cas en què la dosi administrada va ser de 10 mg/kg i la via escollida la i.v., els resultats varen mostrar que les concentracions plasmàtiques de tilosina disminuïen ràpidament en el transcurs de la primera hora. A partir d'aquí, els nivells plasmàtics continuaven baixant lentament, i eren quantificables fins a les 10 hores postadministració en la majoria dels animals estudiats. Aquest primer ràpid decreixement a nivell sanguini de les concentracions de tilosina es pot explicar per l'alta liposolubilitat de la molècula, la seva baixa unió a proteïnes plasmàtiques (40 %) (Ziv i Sulman, 1973) i al seu baix grau de dissociació en la sang (33 %) que, en conjunt, fan que la tilosina no quedi retinguda al plasma, es difongui fàcilment cap als teixits (Hamill i cols., 1961), i assoleixi alts nivells en tots ells, inclosos els perifèrics.

Els volums de distribució obtinguts després d'administrar la tilosina per aquesta via als vedells ($V_{d_{\text{àrea}}}$: 7.7 ± 1.1 L/kg i V_{ss} : 4.1 ± 1.5 L/kg) confirmen aquesta ampla distribució tissular, i resulten ser una mica superiors als descrits a la bibliografia per a aquesta espècie per Burrows i cols., (1983), i de l'ordre de 4-7 vegades més grans que els descrits en vaques per Ziv i Sulman, (1973); Gingerich i cols., (1977) i Cester i cols., (1993), en vedells i búfals per Saurit i cols., (2002) i inferiors als descrits per Ziv i cols., (1995) en camells ($V_{d_{ss}}$: 11.9 L/kg). Els $V_{d_{\text{àrea}}}$ descrits en altres espècies (ovelles, cabres, gossos) amb valors que oscil·len entre els 0.86 i els 3.1 L/kg, també van ser inferiors als trobats en el present estudi. Aquestes diferències, que no són molt elevades, poden ésser atribuïdes a la diversitat

d'espècies i relacionades amb la composició tissular i l'estructura anatòmica diferents. També podrien ser degudes a l'edat dels animals. En l'estudi que ens ocupa, els animals utilitzats eren molt joves, cosa que implica un alt volum d'aigua corporal, que pot modificar significativament el volum de distribució si es compara amb animals adults en què l'aigua corporal és menor.

Els valors de $t_{1/2\beta}$ i d'MRT obtinguts després de l'administració del fàrmac per via i.v. (2.7 ± 3.2 i 2.6 ± 2.1 h, respectivament) indiquen una ràpida eliminació del fàrmac de l'organisme, propera a l'observada per altres autors en la mateixa espècie i en gossos i aus (Burrows i cols., 1986; Weisel i cols., 1977; Locke i cols., 1982) que oscil·laven entre 1 i 1.5 hores. També resultats similars, van ser els observats en vaques i ovelles (Ziv i Sulman, 1973); en cabres (Atef i cols., 1991) i en vaques (Cester i cols., 1993) on es van descriure uns $t_{1/2\beta}$ entorn a les 3 hores. En un estudi realitzat en ovelles i cabres s'obtingueren valors de $t_{1/2\beta}$ superiors als d'aquest estudi (4.7 i 4.2 h, respectivament) (Taha i cols., 1999). En tots els casos, s'ha de destacar que l'eliminació de la tilosina es feia de manera ràpida i, en poques hores, el fàrmac ja no era present a l'organisme.

La depuració mitjana observada (24.8 ± 7.03 mL/min/kg) fou similar a l'obtinguda en vedells (23.7 mL/min/kg) per Burrows i cols., (1986) i en gossos (21.9 mL/min/kg), i superior als valors obtinguts en diferents espècies com ovelles, cabres, vaques (6-8 mL/min/kg) (Taha i cols., 1999; Atef i cols., 1991; Cester i cols., 1993; Baggot i Gingerich, 1976). En un estudi fet amb camells i en un altre portat a terme en rates es van obtenir valors de Cl molt superiors als del present estudi (239.3 i 86 mL/min/kg,

respectivament) (Ziv i cols., 1995; Duthu, 1985). Aquestes dades suggereixen una influència de l'espècie a la qual s'administra el fàrmac, així com també, com s'ha assenyalat anteriorment, la possible influència que podria tenir l'edat dels animals utilitzats en els diferents estudis sobre el comportament d'aquest paràmetre, ja que en animals joves el metabolisme hepàtic és inmadur i l'excreció renal és reduïda (De Backer, 1986).

En el cas en què es va administrar la tilosina per via i.m. en una dosi de 20 mg/kg, es pot apreciar una alta variabilitat en les concentracions plasmàtiques durant la primera mitja hora, la qual cosa suggereix que els mecanismes d'absorció en són els responsables. La tilosina, com a molècula irritant, pot causar modificacions tissulars al lloc de la injecció, cosa que es tradueix en una alta variabilitat en la velocitat d'incorporació del fàrmac al torrent circulatori.

A la dosi de 20 mg/kg el perfil presentat va ser similar a l'observat quan s'administrava una dosi de 10 mg/kg, però amb una major variabilitat. Aquest fet s'explicaria per el diferent grau de retenció de fàrmac observat al lloc d'injecció en els diferents animals. La C_{max} es va assolir aproximadament a les 2 hores postadministració. A partir d'aquí, les concentracions es mantenen més o menys constants (replà de concentracions) durant les primeres 6 hores. En alguns animals es varen trobar nivells detectables fins a les 24 hores i en altres fins a les 48 hores. Aquest tipus de perfil s'ajustaria a un procés d'absorció lenta i continuada des del punt d'injecció en el múscul, fet que concordaria amb una retenció del fàrmac en els teixits inflamats.

Els quocients de les AUC i.m. respecte a les AUC i.v. presenten una elevada variabilitat, cosa que dóna com a resultat una biodisponibilitat mitjana del 73.7 ± 46.2 %, i el que suggereix que encara que el procés d'absorció sigui lent, el fàrmac s'incorpora a la sang gairebé completament amb una bona biodisponibilitat. La variabilitat observada concordaria amb la que es dóna en la primera fase de la corba de nivells plasmàtics i que correspon a la variabilitat en la fase d'absorció. Els valors de biodisponibilitat trobats en altres estudis existents en diferents espècies com camells, ovelles i cabres van ser similars als del present estudi, i oscil·laven el 73 % i el 88 % (Ziv i cols., 1995; Taha i cols., 1999; Atef i cols., 1991).

Els valors de MRT i de $t_{1/2\beta}$ obtinguts són molt superiors als de la via i.v., igual com passava quan s'administrava una dosi i.m. de 10 mg/kg, cosa que confirma l'endarreriment en l'eliminació del fàrmac de l'organisme a causa de la lenta absorció d'aquest des del punt d'injecció. Això és confirmat pel valor, força elevat, observat de MAT (11.8 h), paràmetre que reflecteix el temps mitjà d'absorció. Aquestes dades fan pensar que es produeix un efecte *flip-flop*, cosa que voldria dir que l'absorció del fàrmac des del lloc d'injecció en condiciona de manera significativa l'eliminació.

Si es comparen els resultats obtinguts després d'administrar les dues dosis (10 i 20 mg/kg) per via i.m., s'observa que quan la dosi administrada era de 20 mg/kg, la C_{\max} (de la mitjana de les concentracions) s'assolia més tard (120 min) i els nivells plasmàtics eren aproximadament el doble que els obtinguts després d'administrar una dosi de 10 mg/kg. És a dir, en augmentar la dosi es trobaren valors de C_{\max} més grans. Si s'observa la figura 19 es pot veure que en doblar la dosi, les concentracions sanguínees augmenten de manera considerable, i passen d'un valor d'AUC de

244.2±80.8 a 987.2±335.9 µg·min/mL. És lògic pensar que a mesura que s'incrementa la dosi administrada les concentracions plasmàtiques augmenten, i que per tant paràmetres com l'AUC i la C_{\max} es veuen incrementats, generalment, d'una manera lineal. Aquestes dades suggereixen que, en aquest interval de dosis, no hi ha saturació en els processos d'absorció a nivell intramuscular i que el procés d'absorció segurament segueix una cinètica lineal.

Quan s'administra una dosi de 20 mg/kg, i encara més, l'allargament del temps en què les concentracions plasmàtiques es mantenen en uns nivells similars entorn a 1 µg/ml (durant més de 6 hores) fa pensar, com ja s'ha reflectit abans, que una part de la dosi administrada queda retinguda al punt d'injecció durant moltes hores, fet que es va confirmar en l'estudi de depleció de residus, en què als 21 dies postadministració de la tilosina encara es detectaven nivells de fàrmac en el múscul on es va fer la injecció. Aquesta retenció del fàrmac en el punt d'injecció pot ésser deguda, com ja s'ha indicat anteriorment, tant a les característiques irritants de la mateixa tilosina, com als excipients que la vehiculen, que en el present estudi eren propilenglicol i alcohol benzílic. El fet que la tilosina sigui una molècula altament liposoluble, amb caràcter de base feble i amb facilitat per travessar les membranes, fa pensar que el seu transport és bàsicament passiu i no saturable, cosa que fonamenta la idea que aquesta absorció sostinguda sigui probablement deguda al procés inflamatori i no a una possible saturació d'un transport actiu o mediat per transportadors.

Pel que fa a la t_{\max} s'ha descrit en altres estudis que aquesta pot assolir-se abans o després en augmentar la dosi respecte a una dosi menor, depenent del tipus de macròlid que es tracti (Williams i Sefton, 1993).

Si es comparen els paràmetres obtinguts després d'administrar una dosi de 10 i de 20 mg/kg respectivament, es troba que els valors de $t_{1/2\beta}$ no presenten diferències estadístiques significatives. Això confirmaria que un cop a la sang el fàrmac és eliminat de l'organisme independentment de la dosi a la qual ha estat administrat.

Des del punt de vista de l'eficàcia del producte, les concentracions plasmàtiques assolides en la dosi de 10 mg/kg (dosi mínima recomanada en bovins) són força baixes, però es mantenen estables des de la primera fins a la tercera hora postadministració amb concentracions de 0.5 µg/mL. A les 8 hores postadministració, els nivells són encara de 0.4 µg/mL, concentració que es troba lleugerament per sobre de les CMI dels principals agents etiològics de malalties que afecten els vedells, com el *Mycoplasma bovis* (CMI₅₀ 0.097 µg/mL) (Prescott, 2000), causant de la pneumònia i de l'artritis, i d'altres micoplasmes, així com ureaplasmes (CMI₅₀ 0.08 µg/mL) (Prescott, 2000), i estreptococs. Aquests nivells plasmàtics de tilosina també serien efectius contra altres bacteris patògens que afectarien més a animals adults, com el *Corynebacterium pyogenes*, causant de la metritis, o la *Moraxella bovis* productora de la queratoconjuntivitis.

Quan s'administra una dosi de tilosina de 20 mg/kg a vedells, els resultats mostren que les concentracions plasmàtiques són superiors al doble dels observats en la dosi de 10 mg/kg, això suggereix, com era d'esperar, que el nombre de microorganismes sensibles a la tilosina serà més elevat si s'augmenta la dosi. Entre aquests es poden incloure certes soques d'estafilococs, d'estreptococs i el *Fusobacterium necrophorum* (CMI₅₀ 1.56 µg/mL), bacteri oportunist, causant d'abcessos hepàtics en animals adults (Nagaraja i cols., 1999).

Altres microorganismes amb CMI_{50} superiors als 100 $\mu\text{g/mL}$, com la *Pasteurella* i la *Bordetella*, i per als quals l'ús d'aquest antibiòtic està indicat, semblaria que no són sensibles a la tilosina en cas d'una bacterièmia, però en canvi hi ha estudis clínics en els quals s'ha comprovat que la tilosina, administrada a vedells per via oral en una dosi de 2 g/dia, redueix la incidència de la pneumònia en vedells i el nombre de bacteris crescuts en mostres de teixit aïllades del pulmó com *Pasteurella multocida* (Matsuoka i cols., 1980).

En els assaigs clínics s'ha observat que, malgrat que els nivells plasmàtics de tilosina siguin menors que les concentracions a les CMI d'alguns bacteris patògens, aquest antibiòtic és efectiu. Aquesta eficàcia podria respondre a la facilitat que té la tilosina, com d'altres macròlids, d'acumular-se en macròfags alveolars amb una concentració intracel·lular 10 vegades superior a l'extracel·lular (Chamberland, 2001, comunicació personal). Un antecedent que confirmaria aquest fet seria un estudi realitzat en vedells als quals se'ls administrava tilosina i.m. (17.6 mg/kg), i en els que es van trobar concentracions pulmonars de tilosina (11.47 $\mu\text{g/g}$) molt superiors a les trobades en plasma (0.67 $\mu\text{g/g}$) a les 12 hores postadministració (Van Duyn i Folkerts, 1979).

Alguns autors (Gunderson i cols., 2001; Sánchez, 2000) suggereixen que quan la C_{max} és com a mínim unes 10 vegades superior a la CMI_{90} , o bé quan l' $AUC_{0-24\text{h}}$ ho és unes 125 vegades, així com quan es dona un interval posològic superior a la CMI_{90} en un 50 % de l'interval total de dosificació, es pot considerar que els nivells d'antimicrobià són suficients per a eliminar el bacteri sensible. En general, els macròlids són considerats fàrmacs tempsdependents, per aquesta raó els paràmetres més significatius per al

fàrmac que ens ocupa serien, en termes generals, el temps en el qual les concentracions plasmàtiques estarien per sobre de la CMI_{90} o també l' AUC_{0-24h}/CMI . Però el fet que no hi hagin estudis PK/PD publicats en l'àmbit de fàrmacs d'ús exclusiu veterinari (tilosina) que permetin escollir quin seria l'índex més adient, fa que s'hagi hagut de tenir-los tots en compte per avaluar l'eficàcia de la tilosina en aquest estudi.

Els resultats obtinguts per a aquests tres paràmetres en relació amb els valors de CMI obtinguts de la literatura suggereixen que, en general, en els vedells, les infeccions respiratòries, causades per micoplasmes, i d'altres malalties, com la queratoconjuntivitis provocada per *Moraxella* i la metritis causada per *Corynebacterium pyogenes*, es podrien resoldre amb una dosi de 20 mg/kg de tilosina administrada per via i.m.. Tenint en compte el paràmetre AUC_{0-24h}/CMI , la dosi administrada en aquest estudi també seria efectiva per combatre infeccions produïdes per estafilococs i estreptococs. L'èxit clínic de la tilosina sobre la resta de malalties en què no es compleixen tots tres paràmetres, ja que són produïdes per bacteris amb CMI molt superiors (*Pasteurella*, *Bordetella*), es podria explicar per l'esmentat efecte acumulatiu que aquesta presenta en els macròfags i/o a l'efecte postantibiòtic potenciador dels leucòcits que faria que, un cop tractat l'animal amb el fàrmac, els bacteris fossin més susceptibles a ser fagocitats i destruïts (Van Bambeke i Tulkens, 2001).

5.1.2. Estudi del perfil cinètic de la tilosina en porcs

En l'avaluació del perfil cinètic de la tilosina en porcs després de l'administració i.v. de tilosina en una dosi de 10 mg/kg, els resultats obtinguts suggereixen que, quan s'administra l'antibiòtic per aquesta via, aquest es distribueix ràpidament des de la sang cap als teixits de manera similar a l'observada en vedells, per tant, com s'ha descrit anteriorment, les característiques físicoquímiques del fàrmac n'afavoreixen la distribució fins als teixits (Anadón i Reeve-Johnson, 1999). Això es veu confirmat amb els alts volums de distribució observats, tant pel que fa al $Vd_{\text{àrea}}$, com per al Vd_{ss} (14.4 i 9.0 L/kg, respectivament).

Hi ha pocs treballs publicats referents a estudis farmacocinètics en porcs, el que dificulta la contrastació del present treball amb els d'altres autors.

El volum de distribució observat va resultar ser molt més alt que el descrit per diferents autors en vaques (1.1 L/kg) (Baggot i Gingerich, 1976), vedells (3.5-5.6 L/kg) (Burrows i cols., 1986), búfals (1.3 L/kg) (Saurit i cols., 2002), cabres (1.7 L/kg) (Atef i cols., 1991), ovelles (0.73 L/kg) (Taha i cols., 1999) i gossos (1.7 L/kg) (Weisel i cols., 1977). El volum de distribució en l'estat d'equilibri també va ser més gran que el de la majoria de les espècies citades, però lleugerament inferior a l'observat en camells (11.9 L/kg). De la mateixa manera que ja s'ha expressat en l'avaluació de la cinètica de la tilosina en vedells, aquestes diferències podrien ser degudes a la composició tissular diferent que presenten cadascuna de les espècies a les quals es fa referència i a l'edat dels animals tractats que en alguns estudis són animals adults i en d'altres, animals molt joves. Tots dos volums de distribució van ser superiors, aproximadament el doble, que els trobats en

aquest estudi per als vedells. Això podria estar en relació amb les característiques tissulars d'ambdues espècies ja que la tilosina, com a fàrmac liposoluble que és, es distribueix bé fins al teixit greixós, com s'ha pogut observar en l'estudi de residus, i anatòmicament els porcs disposen d'un panícul adipós molt superior al dels vedells, i d'aquesta manera el fàrmac podria quedar retingut en major quantitat en aquest teixit.

Tant els valors de $t_{1/2\beta}$ com els de MRT observats, suggereixen que l'eliminació del fàrmac es produeix ràpidament, encara que d'una manera lleugerament més lenta que en els vedells. No obstant això, s'ha de considerar l'alta variabilitat que presenten aquests paràmetres en aquestes espècies. Comparant aquestes dades amb d'altres estudis, s'observa que en els porcs el $t_{1/2\beta}$ és superior a l'observat en d'altres espècies (vaques, vedells, cabres, ovelles, gossos i aus) en els quals es trobaven entre uns valors de 0.91 i 3.04 h i similars als observats en un altre estudi realitzat en ovelles i cabres (4.7 h). Pel que fa a l'MRT, només és té constància d'un estudi realitzat per Cester i cols., (1993) en vaques on aquest paràmetre era molt inferior (1.70 ± 0.21 h) a l'obtingut en porcs.

L'aclariment plasmàtic observat va ser lleugerament superior a l'obtingut en el present estudi per a l'espècie bovina i superior també a la resta d'espècies de les quals es tenen dades publicades, això no obstant, aquestes diferències no van ser significatives.

En el cas en què es va administrar el fàrmac per via i.m. en una dosi de 10 mg/kg, s'aprecia una lenta però continuada absorció d'aquest des del punt d'injecció, i s'assoleix la C_{max} de la mitjana entorn a les 3 h de la seva administració. A la vegada, es trobaren uns alts valors de $t_{1/2\beta}$ i de MRT (5 i

7 vegades més grans, respectivament, que els obtinguts en l'administració i.v.), resultat de l'eliminació del fàrmac que es produeix d'una manera lenta. Aquest alentiment en l'eliminació podria ser atribuït principalment a dos factors: el primer seria la lenta absorció del fàrmac des del punt d'injecció, segurament produïda, de la mateixa manera que en vedells, per les característiques irritants de la mateixa tilosina i pels excipients que formen part d'aquesta formulació; i el segon, per la possible retenció del fàrmac en el greix i en els teixits perifèrics que es podria explicar per la gran lipofília i l'alta distribució tissular de la molècula, fenòmens que provocarien un alentiment en el retorn del fàrmac des dels teixits cap a la sang. Fet que estaria corroborat per l'alt valor de MAT (1794.9 ± 608 min) obtingut. Aquests factors explicarien que encara es trobi fàrmac a la sang a les 72 hores postadministració. Això també és confirmat pels resultats dels estudis de residus en què als 7 dies postadministració encara es trobaven concentracions elevades de tilosina en el punt d'injecció.

A partir dels valors obtinguts de MAT (1794.9 ± 608 min) i de MRT (1909.4 ± 640.4 min), que com es pot observar són similars, es pot concloure que la velocitat amb què el fàrmac és eliminat és igual a la que és absorbit, és a dir, que l'absorció en condiciona la depuració, i dona lloc al denominat fenomen de *flip-flop*, com ja s'ha descrit anteriorment per als vedells.

Aquest comportament de la molècula de tilosina es veu confirmat pels resultats obtinguts en un estudi realitzat recentment en el nostre departament, en què després d'administrar una dosi de 10 mg/kg de tilosina a vaques lleteres per via i.m. durant 5 dies, es van trobar concentracions de tilosina en llet fins als 9 dies després de l'últim tractament, i es van apreciar pujades i baixades notables dels nivells de fàrmac en llet en les mostres

procedents de les diferents munyides recollides. El fet que els dos compartiments (sang-llet) estiguin directament connectats, fa que les concentracions de tilosina trobades en llet serveixin per a recolzar el comportament farmacocinètic (absorció lenta) que va presentar la molècula després de ser administrada tant a vedells com a porcs per via i.m..

La biodisponibilitat obtinguda després d'administrar la tilosina per via i.m. va ser molt alta, cosa que demostra que l'absorció de la tilosina per aquesta via es produeix de manera lenta però completa. Aquestes dades són similars a les obtingudes en cabres (Taha i cols., 1999; Atef i cols., 1991), en camells (Ziv i cols., 1995) i en ovelles (Taha i cols., 1999).

Si s'avalua l'eficàcia del fàrmac en funció de les concentracions plasmàtiques assolides després d'administrar la dosi de 10 mg/kg, s'ha de constatar que aquestes van ser relativament baixes. Malgrat això, durant més de 2 dies postadministració, en alguns animals, les concentracions plasmàtiques encara assolien nivells per sobre de les CMI d'alguns bacteris patògens com l'*Erysipelothrix rhusiopathiae* i *Mycoplasma sp.* (CMI₅₀<0.1µg/mL), causants de l'erisipela i de pneumònies, respectivament. Aquestes dades, referides a aquests microorganismes en concret, suggereixen que la pauta terapèutica recomanada de 10 mg/kg cada 24 hores seria adient, i que inclús podria ampliar-se l'interval entre dosis.

Tal com s'ha comentat abans per als bovins, si es prenen els tres paràmetres C_{max}/CMI, AUC_{0-24h}/CMI i T>CMI per avaluar l'eficàcia del tractament amb tilosina, s'observa que per als bacteris citats anteriorment l'administració d'una dosi de 10 mg/kg de tilosina per via i.m. seria suficient per inhibir el creixement d'aquests microorganismes.

Com s'ha comentat abans, cal destacar la capacitat de la tilosina per acumular-se en macròfags alveolars, i fer que augmenti la seva eficàcia contra infeccions respiratòries (Chamberland, 2001, comunicació personal). En un estudi fet en rates tractades durant 10 dies amb tilosina per via oral (aigua de beguda) també s'hi van trobar concentracions en pulmó 10 vegades superiors a les trobades en plasma (Carter i cols., 1987).

Altres microorganismes que pertanyen als gèneres *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium* i que tenen uns valors de CMI₅₀ intermedis (1.06, 0.4 i 0.4 µg/mL) també serien sensibles a l'acció de la tilosina i, per tant, aquesta podria ser efectiva en el tractament de l'artritis porcina, produïda per aquests bacteris. Tenint en compte la relació AUC_{0-24h}/CMI, es pot suggerir que aquesta dosi seria efectiva contra aquests bacteris i també contra el *Fusobacterium*. I si es té en compte la relació T>CMI llavors els bacteris sensibles a la tilosina serien *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* i *Corynebacterium*.

Pel que fa als altres bacteris patògens contra els quals està indicada la tilosina, com els microorganismes dels gèneres *Fusobacterium*, *Vibrio*, *Pasteurella* i *Bordetella*,— agents causants de malalties com la disenteria, la rinitis atròfica i la pneumònia— les concentracions plasmàtiques trobades no serien efectives, per ser inferiors a les seves CMI (*Fusobacterium*, CMI₅₀ 1.56 µg/mL; *Vibrio*, CMI₅₀ 5 µg/mL; *Pasteurella multocida*, CMI_{50/90} 13 µg/mL i *Bordetella*, CMI_{50/90} >200 µg/mL); en canvi, la gran afinitat de la molècula envers els teixits i la seva tendència a acumular-se en cèl·lules de la línia blanca fan pensar que, d'aquesta manera, la tilosina pot acabar efectuant la seva acció antibiòtica contra aquests microorganismes i ser efectiva contra aquestes malalties.

Aquest fàrmac està indicat en el tractament d'infeccions respiratòries en la majoria dels països europeus, els Estats Units, Canadà, etc. Aquestes especialitats farmacèutiques estan avalades per assatjos clínics, les dades del quals han estat avalades i estan protegides per les autoritats sanitàries responsables d'autoritzar-les. Per aquest motiu, s'ha de suposar que els estudis *in vivo* confirmen l'eficàcia de l'ús de tilosina en les infeccions respiratòries de bovins i porcs, i segurament, aquests estudis demostren que l'acumulació d'aquest fàrmac en els macròfags en facilita l'acció terapèutica, encara que les concentracions plasmàtiques no siguin un factor totalment confirmatori.

5.2. ESTUDI DE LA DEPLECIÓ DE RESIDUS DE LA TILOSINA DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ PER VIA INTRAMUSCULAR

5.2.1. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en vedells

Els resultats de l'estudi de la depleció de residus de la tilosina després d'administrar una dosi de 20 mg/kg/dia durant 5 dies a 12 vedells, i de sacrificar-los en diferents períodes mostra que la desaparició del fàrmac de la major part dels teixits (múscul, fetge i greix) es produeix abans dels 7 dies postadministració. Al setè dia només es troben nivells per sobre de l'LMR al ronyó i al punt d'injecció.

En el teixit muscular, adipós i hepàtic, les concentracions trobades al 7è dia de sacrifici van estar per sota del LQ, fet que no va permetre dur a terme l'estudi estadístic (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996).

El ronyó és un dels principals teixits encarregats de l'eliminació de la tilosina de l'organisme; per aquesta raó encara s'hi troben nivells quantificables de tilosina quan aquesta ja no ho és al fetge. De nou, el temps de mostreig realitzat va impedir aplicar l'estadística als resultats.

Malgrat els nivells tan alts de tilosina trobats al punt d'injecció als 21 dies postadministració, aquests només representen un 0.001 % de la quantitat total de fàrmac administrat, calculat sobre 300 g de mostra al voltant del punt d'injecció (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996). Això voldria dir que el fàrmac s'acaba absorbint completament, encara que d'una forma lenta, i passa d'un contingut de tilosina respecte a la total administrada del 0.009 %

als 7 dies fins a un 0.004 % als 14 dies. En alguns animals s'ha vist la formació de quists a la zona on es va administrar el fàrmac, a causa de l'efecte irritant atribuït a la mateixa tilosina i als excipients que formen part d'aquesta especialitat farmacèutica.

Hi ha molt pocs estudis publicats sobre la depleció de residus de tilosina en vedells administrada per via oral o intramuscular. Només és té constància d'un treball en què s'estudiava la presència de residus en els diferents teixits diana de vedells i vaques tractats per via i.m. o i.v. amb tilosina, en sacrifici d'urgència. La determinació dels residus es va fer amb una anàlisi microbiològica, que va donar negativa en múscul a les 24 h i positiva en ronyó a les 31 h postractament (Nouws i Ziv, 1977). Aquests resultats estan en la línia dels del present estudi, ja que el ronyó és el teixit on el fàrmac roman durant més temps.

Altres estudis no publicats, descriuen que, després d'administrar tilosina a vedells per via i.m., es detecten residus de tilosina per sobre de l'LMR als 3 dies postadministració en fetge, múscul i ronyó. En greix, transcorregut aquest temps, els nivells van ser no quantificables; mentre que en ronyó, encara ho eren als 7 dies. Aquestes dades estarien d'acord amb les observades en el present estudi, en què també s'han trobat nivells quantificables de fàrmac als 7 dies en aquest teixit diana.

Si es té en compte el punt d'injecció, tal com indica la guia (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996), per poder fixar el temps d'espera i es fa un càlcul estadístic de les concentracions, representades en la figura 19, aquest dona un resultat de 92.5 dies amb un interval de confiança del 95 %, per tan s'hauria d'esperar 3 mesos abans de portar l'animal a l'escorxador

per al consum alimentari. El reduït nombre d'animals emprats en aquest estudi i la variabilitat de les dades en el punt d'injecció serien les responsables d'aquest valor tan elevat de temps d'espera quan s'aplica la tolerància i la confiança d'un 95 %.

Si es tenen en compte les concentracions trobades al ronyó, i es seguís la recomanació de l'EMEA consistent en aplicar un marge de seguretat del 30 % sobre el primer període de sacrifici en el que totes les concentracions es trobaven per sota de l'LMR; és a dir, 14 dies, suposaria un temps d'espera de 18 dies per l'especialitat estudiada.

Aquestes discrepàncies entre el que succeeix en els teixits de consum habitual i el punt d'injecció posen en evidència les dificultats de treballar amb conceptes com el de la toxicitat crònica, que serveix per a definir el terme IDA i el d'una ingesta circumstancial, com pot ser la inclusió en la dieta d'un tros de múscul procedent del punt d'injecció i que comportaria per a la persona afectada, una toxicitat aguda.

Aquest és un tema llargament discutit per la comunitat científica, el CVMP, el VICH, sense que s'hagi pogut arribar encara a cap conclusió pel que fa a l'LMR per al punt d'injecció.

A més, cal afegir que en el punt d'injecció sempre es trobarà el principi actiu administrat junt amb els excipients, mentre que en els altres teixits s'hi pot trobar el principi actiu administrat i els metabòlits d'aquests, o només els metabòlits. Aquest seria el cas de la ivermectina, fàrmac que es metabolitza ràpidament en H2B1a ivermectina, que és el residu marcador; o

bé l'enrofloxacina que es transforma en ciprofloxacina en el fetge, fet que comporta que el residu marcador sigui enrofloxacina+ciprofloxacina.

Aquests fets expliquen la dificultat d'aplicar l'LMR del múscul per a calcular el temps d'espera a partir del múscul del punt d'injecció.

5.2.2. Estudi de la depleció de residus de la tilosina en porcs

L'estudi de la depleció de residus de tilosina després d'administrar 10 mg/kg/dia durant 5 dies a 16 porcs i de sacrificar-los en diferents temps mostra que el fàrmac s'acumula poc en múscul i fetge, mentre que se'n troben concentracions majors en ronyó, greix i, sobretot, en el punt d'injecció.

Als 3 dies postadministració, les concentracions de tilosina corresponents al múscul i al fetge es trobaven per sota de l'LMR. En ronyó i pell+greix només un animal superà l'LMR.

Al 7è dia postractament, les concentracions en fetge varen disminuir fins a nivells per sota del límit de quantificació, cosa que indica que la depleció en aquest teixit es fa molt ràpidament. Els nivells de tilosina en pell+greix es trobaven en tots els animals, excepte en un, per sota del límit de quantificació, i mostraven una gran variabilitat intraindividual en la depleció de la tilosina des d'aquest teixit. En ronyó, només un animal va superar l'LMR. Pel que fa al punt d'injecció i en aquest període de sacrifici, encara es varen observar nivells de tilosina per sobre de l' LMR en tots els animals.

Als 10 dies postadministració ja no s'observaven nivells de tilosina quantificables en cap dels teixits analitzats procedents dels animals tractats.

Les característiques fisicoquímiques de la molècula de tilosina permeten entendre el seu comportament diferencial depenent dels teixits. La seva afinitat envers alguns teixits i la seva excreció per via renal explicaria el fet

de trobar concentracions de tilosina superiors en aquests teixits, respecte al múscul o al fetge.

El tipus de formulació administrada, que actuaria de manera semblant a una preparació retardada, faria que una vegada injectada, la tilosina s'alliberés lentament des del teixit muscular. Això queda reflectit en les concentracions trobades en el punt d'injecció als 7 dies postadministració, que superen l'LMR gairebé en tots els animals. La concentració més alta trobada en un dels animals en aquest període només representaria un 0.14 % de la quantitat total del fàrmac administrat, calculat sobre 300 g de mostra al voltant del punt d'injecció, i un 0.04 % si es té en compte la resta dels animals. Això, junt amb la disminució considerable de les concentracions trobades en aquest punt en els posteriors períodes de sacrifici corroboraria que l'absorció de la tilosina es fa de manera gairebé completa, i és pràcticament insignificant el risc per a la salut del consumidor per la presència del fàrmac en el lloc d'injecció.

Altres estudis descrits en què la tilosina va ser administrada a porcs a través del pinso, van mostrar que després d'administrar una dosi de tilosina de 200 o 400 mg/kg en pinso se'n detectaven residus a les 3 hores de retirar el menjar en fetge i ronyó (entre 30 i 60 µg/kg) però no en múscul. Kline i Waitt, (1971); Lauridsen i cols., (1988) trobaren residus de tilosina en fetge de porcs (550 µg/kg) a les 0 hores després d'administrar 1000 mg/kg de tilosina en pinso, però no van trobar residus superiors als 200 µg/kg després d'administrar 500, 200 i 100 mg de tilosina per kg de pinso. A les 48 hores de retirar el pinso ja no van trobar presència de residus en cap teixit en les diferents dosis assajades. Vassilopoulos i cols., (1979) tampoc van trobar residus de tilosina en múscul, teixit adipós, ronyó ni fetge 2 dies després

d'administrar 20 mg de tilosina per kg de pinso. Aquestes dades confirmarien la ràpida eliminació del fàrmac de l'organisme i que, en el cas de l'administració per via i.m., el punt d'injecció seria el reservori que allargaria la presència de la tilosina en els animals tractats.

Aquests resultats refermarien, un cop més, la clara influència de la via d'administració en el temps de residència del fàrmac en l'organisme, que dóna com a resultat un temps de depleció dels residus en els teixits diana molt diferents segons la via utilitzada. Així, quan la tilosina s'administra per via oral, els nivells tissulars són baixos, segurament per la reduïda taxa d'absorció del fàrmac per aquesta via en porcs.

En comparar la depleció dels residus de tilosina en els vedells i els porcs objecte d'aquest estudi es pot veure que als 7 dies de sacrifici es troben concentracions de tilosina per sobre de l'LMR en molts dels teixits de porcs (múscul, ronyó, greix i punt d'injecció) i, en canvi, en els vedells únicament s'observen concentracions quantificables en ronyó i punt d'injecció. Això, segurament, és degut principalment a les diferències entre espècies pel que fa a la composició tissular i, per tant, a la distribució de la tilosina en els teixits, particularment en el greix, i està d'acord amb els $t_{1/2}$ i MRT observats, que són més llargs per als porcs.

Si es comparen els resultats obtinguts en l'actual estudi amb els presentats en estudis en què la tilosina va ser administrada per via i.m. a altres espècies es pot apreciar que per a les diferents dosis recomanades per a cada espècie i via, la depleció es produeix de manera més ràpida en porcs que en pollastres, i que en aquests últims es van detectar nivells de tilosina en la pell del punt d'injecció fins als 25 dies (Nogawa i cols., 1982). En canvi, la

depleció va ser més lenta en porcs que en vaques, si no es considera el punt d'injecció, en les quals a les 24 h de l'administració d'aquesta ja no existien nivells en múscul (Nouws i Ziv, 1977). Aquestes dades estarien d'acord amb les trobades en el present estudi. No obstant això, s'ha de tenir en compte, com ja s'ha assenyalat anteriorment, que la forma farmacèutica, la via d'administració, la posologia, etc. són factors que modificaran considerablement la cinètica del fàrmac i per tant el temps d'espera.

Si es relacionen les concentracions plasmàtiques i les concentracions tissulars assolides en un mateix temps en porcs, es pot veure que als 3 dies de l'administració d'una dosi de 10 mg/kg de tilosina per via i.m. la concentració de tilosina és de 0.13 µg/mL en plasma. En aquest mateix moment, les concentracions mitjanes de tilosina en múscul són de 0.05 ppm, en fetge i pell+greix de 0.08 ppm, en ronyó de 0.12 ppm, i de 1.09 ppm en el punt d'injecció. Moats i cols., (1985) després d'administrar per via i.m. una dosi similar a porcs, es va trobar que a les 4 hores del tractament la tilosina en sang era de 0.65 ppm i en múscul, fetge, ronyó i punt d'injecció era d'1.1, 0.37, 0.55 i 55 ppm, respectivament. Les relacions entre el plasma i teixits com el fetge i el ronyó, els quals són teixits ben irrigats i per tant, on els fàrmacs fàcilment s'equilibren amb les concentracions sanguínies, són similars en ambdós estudis.

A partir de les dades obtingudes en tots els teixits, incloent-hi el punt d'injecció, es va realitzar el càlcul del temps d'espera en porcs aplicant el mètode d'aproximació, amb un marge de seguretat del 30 % (pitjor del casos), sobre el període en què tots els teixits estan per sota de l'LMR (10 dies). El resultat ha estat un temps d'espera del producte de 13 dies, és a dir, que caldria esperar aquest període després d'administrar tilosina a la dosi i a

la pauta recomanada per assegurar que no es troben residus per sobre de l'LMR en cap del teixits diana, i per tant que no hi ha cap risc per a la salut del consumidor. En canvi, si s'aplica el càlcul estadístic sobre l'únic teixit en què es podria aplicar (punt d'injecció), sempre i que en el dia 10 el valor inclòs correspongui a la meitat del límit de quantificació, tal com recomana l'EMEA, el resultat obtingut és de 24.4 dies. De nou, s'observa que l'aplicació del mètode estadístic quan es tenen pocs animals i gran variabilitat, dóna valors de temps d'espera lleugerament diferents respecte a la aplicació del mètode de l'aproximació. A més, en el punt d'injecció, igual com s'ha observat en vedells, la variabilitat entre animals és molt gran a causa del possible enquistament del fàrmac en els teixits, que fa que l'alliberament al líquid intersticial i a la sang segueixi un procés erràtic que dóna molta variabilitat.

Si es compara el resultat del temps d'espera obtingut en prendre com a teixit de referència el múscul del punt d'injecció en vedells (92.5 dies), s'observa que és molt superior a l'obtingut en porcs (24.4 dies), fet que es podria explicar per les diferents característiques fisicoquímiques dels teixits en aquestes espècies, que farien que el fàrmac quedés retengut en major o menor proporció. Si es té en compte el resultat obtingut d'aplicar el marge de seguretat del 30 % en porcs (13 dies) es veu que aquest encara és més curt que l'obtingut d'aplicar l'estadística. Com que el nombre d'animals utilitzats per a fer aquests estudis no és gaire alt, potser seria convenient agafar el període de temps més llarg per evitar possibles riscos de cara a la salut del consumidor.

Com ja s'ha indicat en l'apartat dels vedells, el fet que la legislació vigent consideri el punt d'injecció com un teixit més (muscular), fa que aquest determini en molts casos el període de retirada per a molècules que per la seva composició tenen una absorció lenta des del punt d'administració. En canvi, és difícil que una persona consumeixi cada dia carn corresponent a aquesta zona i, per tant, seria improbable que s'intoxiqués a causa del consum d'aquesta. Per això, seria convenient l'establiment d'un LMR especial per al múscul provinent d'aquesta zona, ja que el consum d'aquest no és tant freqüent com el de la resta de múscul de l'animal, i l'avaluació del benefici/risc és diferent al que s'utilitza per al múscul de consum habitual en la dieta de les persones.

No obstant això, una conclusió que s'ha de treure d'aquests dos estudis de residus/temps d'espera és que la fixació d'un temps de mostreig i de nombre d'animals correctes és fonamental per dur a terme una avaluació ajustada d'aquest paràmetre tan important que és el temps d'espera, per evitar que cap teixit arribi al consum i pugui suposar un risc per a la salut del consumidor. La selecció del temps de mostreig ha d'èsser el resultat de l'anàlisi del perfil cinètic del producte utilitzat, que és el que ens indicarà quina és la permanència i la distribució del fàrmac en l'espècie de destí.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El perfil cinètic de la tilosina s'ajusta a un comportament bifàsic, una fase ràpida on predomina la distribució cap als teixits, i una lenta caracteritzada pels processos d'eliminació.
2. La tilosina base administrada per via i.v. a vedells i a porcs es distribueix àmpliament, assoleix Vd_{area} de 7.8 i 14.4 L/kg i V_{ss} de 4.2 i 9.0 L/kg respectivament, i s'elimina ràpidament amb l'obtenció de valors de $t_{1/2\beta}$ i de MRT que oscil·len entre les 2.6 i les 5 h.
3. La tilosina base administrada per via i.m. s'absorbeix lentament des del punt d'injecció, a causa, segurament, de les característiques irritants de la tilosina i dels excipients de la formulació, i dona lloc a alts valors de MAT en vedells (11.8 ± 7.6 h) i en porcs (29.9 ± 10.1 min).
4. Els $t_{1/2\beta}$ i els MRT obtinguts després de l'administració per via i.m. en les dues espècies, són més llargs que els obtinguts després de l'administració i.v., cosa que suggereix que la cinètica del fàrmac per aquesta via s'ajusta a un model *flip-flop* en què la lenta absorció d'aquest en condiciona l'eliminació.
5. Després de doblar la dosi de tilosina administrada per via i.m. en vedells, els paràmetres AUC i C_{max} esdevenen també el doble, el t_{max} s'endarrereix però els $t_{1/2\beta}$ no mostren diferències significatives entre ambdues dosis, el que suggereix que els processos d'absorció i d'eliminació no es saturen en aquest marge de dosis.

6. La bona biodisponibilitat obtinguda en vedells després de l'administració i.m. d'una dosi de 10 i 20 mg/kg i en porcs després de l'administració d'una dosi de 10 mg/kg de tilosina confirma que l'absorció de la tilosina és produïda de manera lenta però completa.

7. Les concentracions assolides en plasma després d'administrar una dosi de 10 mg/kg a porcs són baixes, però es mantenen en nivells superiors a les CMI d'alguns bacteris patògens causants de malalties com l'erisipela i algunes pneumònies bacterianes durant un període superior a les 24 hores següents a la seva administració.

8. Les anàlisis PK/PD que relacionen les C_{max} , AUC_{0-24h} i T amb les CMI₅₀ i les CMI₉₀ per a una sèrie de bacteris responsables d'algunes de les infeccions, sobretot respiratòries, que freqüentment s'observen en vedells i porcs, posen de relleu que per a la tilosina aquests paràmetres poden no ésser del tot rellevants per a l'avaluació d'una dosi terapèutica.

9. L'eficàcia de l'administració d'una dosi de 10 mg/kg de tilosina observada en els assaigs clínics envers alguns bacteris causants de malalties com la disenteria i la rinitis atròfica en porcs, i la pneumònia produïda per *Pasteurella* en vedells, suggereix que l'efecte acumulatiu i l'efecte postantibiòtic del fàrmac, descrita per alguns autors, podria ésser la responsable de la resposta antibacteriana d'aquest antibiòtic, ja que les concentracions plasmàtiques obtingudes no en justifiquen l'eficàcia. Això indicaria que l'estudi de mostres de teixits infectats seria la millor aproximació per a una anàlisi PK/PD.

CONCLUSIONS

10. Els estudis de depleció de residus després d'una administració de 10 i 20 mg/kg respectivament, durant 5 dies per via i.m. a vedells i porcs posen de relleu que el fàrmac roman a l'organisme durant més d'una setmana en el cas dels porcs i de tres setmanes en el cas dels vedells.

11. L'acumulació de la tilosina observada en el punt d'injecció demostra que és el factor responsable de l'allargament del temps d'espera en els animals tractats, ja que en la resta dels teixits analitzats (múscul, fetge, ronyó, pell+greix) el fàrmac desapareix fins a nivells no quantificables als 10 i 14 dies en porcs i vedells, respectivament.

12. Els alts nivells de tilosina trobats en el punt d'injecció en vedells als 21 dies i en porcs als 7 dies de temps de sacrifici, representen només un 0.001 % i un 0.04 % respectivament, de la quantitat total de fàrmac administrat, cosa que confirma que l'absorció es produeix de manera completa.

13. D'acord amb els resultats obtinguts després d'administrar la dosi i la pauta terapèutica descrita amb la formulació estudiada, el temps d'espera recomanable, segons la normativa europea, per a garantir la salut del consumidor seria de 92.5 dies en vedells i de 24.4 dies en porcs.

VII. BIBLIOGRAFIA

Almirante, B. (1994) "Macrólidos: viejos antibióticos para nuevas indicaciones terapéuticas". *Med. Clín.* **104**, 139-141.

Alt, D.P. i Bolin, C.A. (1996) "Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* infection in hamster and swine". *Am. J. Vet. Res.* **57**, 59-62.

Anadón, A. i Reeve-Johnson, L. (1999) "Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine". *Res. Vet. Sci.* **66**, 197-203.

Anderson, R.C., Worth, H.M., Small, R.M. i Harris, P.N. (1966) "Toxicological studies on tylosin: its safety as a food additive". *Food Cosmet. Toxicol.* **4**, 1-15.

Arret, B., Johson, D.P. i Kirshbaum, A. (1971) "Outline of details for microbiological assays of antibiotics: second revision". *J. Pharm. Sci.* **60**, 1689-1694.

Atef, M., Youssef, S.A.H., Atta, A.H. i El-Maaz, A.A. (1991) "Disposition of tylosin in goats". *Br. Vet. J.* **147**, 207-215.

Azanza, J.R., Sádaba, B., García, E. i Escolar, M. (1998) "Macrólidos: revisión de su papel en la antibioterapia actual". *Rev. Clín. Esp.* **198**, 66-72.

Babany, G.L. i Pessayre, D. (1988) "Macrolide antibiotics as inducers and inhibitors of cytochrome P-450 in experimental animal and man". *Progress in drug metabolism*, 61-98. Taylor i Francis (Eds.), Londres, G.G. Gibson.

Baggot, J.D. i Gingerich, D.A. (1976) "Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows". *Res. Vet. Sci.* **21**, 318-323.

Baggot, J.D. (1988) "Disposición y destino de los fármacos en el organismo". *Farmacología y terapéutica veterinaria*, 41-79. Booth, N.H. i McDonald, L.E. (Eds.) Zaragoza, Acribia.

Ball, H.J. i McCaughey, W.J. (1987) "Experimental intramuscular inoculation of tylosin in the elimination of ureaplasmas from ewes". *Vet. Rec.* **120**, 557-558.

Barrigón, S., Montañés, P., i Lorenzo, P. (1993) "Tetraciclinas y cloramfenicol. Macrólidos. Otros Antibióticos". *Velázquez. Farmacología*, 16a Ed., 976-997. Velasco, A., Lorenzo, P., Serrano, J.S., i Andres-Trelles, F. (Eds.) Madrid, Interamericana McGraw-Hill.

Barry, A.L., Jones, R.N. i Thorsberry, C. (1988) "In vitro activities of azithomycin (CI-62.993), doxithromicin (A-56268; TE.031), erithomycin, roxithromicin and clindamycin.". *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 752-754.

Barthelemy, P., Autissier, D., Gerbaud, G. i Courvalin, P. (1984) "Enzymatic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*". *J. Antibiotics* **37**, 1692-1696.

Bennett, J.V., Brodie, J.L., Benner, E.J. i Kirby, W.M. (1966) "Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens". *Appl. Microbiol.* **14**, 170-177.

Brisson-Noël, A., Trieu-Cuot, P. i Courvalin, P. (1988) "Mechanism of action of spiramycin and other macrolides". *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 13-23.

Brittain, D.C. (1987) "Erythromycin". *Med. Clin. North Am.* **71**, 1147-1154.

Bryskier, A., Chanton, J.F. i Gasc, J.C. (1986) "Classification and structure-activity relationships of macrolides with emphasis on new developments". *Macrolides: A review with an outlook on future developments*, 7-21. Butzler, J.P. i Kobayashi, H. (Eds.) Amsterdam, Excerpta Medica.

Burrows, G.E., Barto, P.B., Martin, B. i Tripp, M.L. (1983) "Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin and tylosin". *Am. J. Vet. Res.* **44**, 1053-1057.

Burrows, G.E., Barto, P.B. i Martin, B. (1986) "Antibiotic disposition in experimental pneumonic pasteurellosis: gentamicin and tylosin". *Can. J. Vet. Res.* **50**, 193-199.

Carter, K.K., Hietala, S., Brooks, D.L. i Baggot, J.D. (1987) "Tylosin concentrations in rat serum and lung tissue after administration in drinking water". *Lab. Anim. Sci.* **37**, 468-470.

CE Reglament 2377/90. (1990).

CE Reglament 2821/98. (1998)

Cester, C.C., Ganiere, J.P. i Toutain, P.L. (1993) "Effect of stage of oestrous cycle on tylosin disposition in genital tract secretions of cows". *Res. Vet. Sci.* **54**, 32-39.

Chan, W., Gerhardt, G.C. i Salisbury, C.D.C. (1994) "Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography". *J. AOAC Int.* **77**, 331-333.

Chamberland, S. (2001). Comunicació personal.

Chow, A.W., Cheng, N. i Barlett, K.H. (1985) "In Vitro activity of *Clostridium difficile* to new beta-lactam and quinolone antibiotics". *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 842-844.

Clubb, S.L. (1986) Therapeutics: Individual and Flock Treatment Regimens. *Clinical Avian Medicine and Surgery*, 327-355. Harrison, G.J. i Harrison, L.R. (Eds.) Philadelphia, Saunders, W.B.

Coleman, M.R. (1988) "Improved turbidimetric assay of tylosin in premix and animal feeds not containing urea". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 454-456.

Coleman, M.R. i Mowrey, D.H. (1990) "Turbidimetric assay of tylosin in animal feeds containing urea". *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **73**, 927-931.

Crossman, P.J. i Poyser, M.R. (1981) "Effect of inadvertently feeding tylosin and tylosin with dimetridazole to dairy cows". *Vet. Rec.* **108**, 285.

Dámaso, D. (1990) *Antibacterianos*, 25-37, Madrid, Marketing Pharma S.A.

Danielson, N.D., Holeman, J.A., Bristol, D.C., i Kirzner, D.H. (1993) "Simple methods for the qualitative identification and quantitative determination of macrolide antibiotics". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 121-130.

De Backer, P. (1986) "Comparative neonatal pharmacokinetics". *Comparative veterinary pharmacology, toxicology and therapy*, 161-171. Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G. i Debackere, M. (Eds.) Lancaster, MTP Press Limited.

De Liguoro, M., Anfossi, P., Angeletti, R. i Montesissa, C. (1998) "Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography". *Analyst.* **123**, 1279-1282.

Delepine, B., Hurtaud, D. i Sanders, P. (1994) "Identification of tylosin in bovine muscle at the maximum residue limit level by liquid chromatography-mass spectrometry, using a particle beam interface". *Analyst* **119**, 2717-2721.

Delepine, B., Hurtaud, D. i Sanders, P. (1996) "Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry". *J. AOAC Int.* **79**, 397-404.

Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Achene, L. i Cecilia, A. (2001) "Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A.* **926**, 97-104.

Dubois, M., Fluchard, D., Sior, E. i Delahaut, Ph. (2001) "Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. B.* **753**, 189-202.

Duthu, G.S. (1985) "Interspecies correlation of the pharmacokinetics of erythromycin, oleandomycin and tylosin". *J. Pharm. Sci.* **74**, 943-946.

Dvorak, M., Broz, J., Strakova, J. i Sevcik, B. (1982) "Pharmacokinetics, excretion, and residues of Czechoslovak tylosin in pigs". *Biol. Chem. Zivocisne. Vyroby-Vet.* **18**, 77-88.

EMEA/CVMP/036/95 FINAL (1996) "Approach towards harmonisation of withdrawal periods".

EMEA/MRL/205/97 FINAL (1997) "Tylosin. Summary report".

EMEA/V/KG/kg/38896/99 (2000) "EMEA workshop on the requirements and provision of analytical methods for drug residue control in animal products".

EMEA/MRL/732/00 FINAL (2000) "Tylosin. Summary report".

EMEA/MRL/829/02-FINAL (2002) "Tylosin. Summary report".

Farrier, D. S. (1997) PK Solutions 2.0. Noncompartmental pharmacokinetics data analysis. Ashland, USA, Summit Research Services.

Fish, B.J. i Carr, P.R. (1986) "Pharmacopoeial procedure for the determination of tylosin factors by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* **353**, 39-50.

Ford, R.B. i Aronson, A.L. (1985) "Antimicrobial Drugs and Infectious Diseases". *Handbook of Small Animal Therapeutics*, 45-88. Davis, L.E. (Eds.) New York, Churchill Livingstone.

Fuentes, V.O. (1992) "Quimioterapia". *Farmacología y Terapéutica Veterinarias*, 2a Ed., 65-176. Madrid, Interamericana McGraw-Hill.

Gauvin, J. (1993) "Drug therapy in reptiles" *Seminars in Avian & Exotic Med.* **2**, 48-59.

Gingerich, D.A., Baggot, J.D., i Kowalski, J.J. (1977) "Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows". *Can. Vet. J.* **18**, 96-100.

Goldman, R.C. i Capobianco, J.O. (1990) "Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14- and 15-membered macrolides in *Staphylococcus epidermidis*". *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1973-1980.

Grove , D.C. i Randall, W.A. (1955) "Assay methods of antibiotics. A laboratory manual" New York, Medical Encyclopedia Inc.

Gueorguieva, T.M., Kanelov, I.N., Gueorguiev, I.P., i Eckersall, P.D. (1998) "A comparative study of serum creatine kinase activity after intramuscular injections of two tylosin dosage forms in pigs". *Rev. Med. Vet.* **149**, 8-9.

Gunderson, B.W., Ross, G.H., i Rotschafer, J.C. (2001) "What do we really know about antibiotic pharmacodynamics". *Pharmacotherapy.* **21**, 302-318.

Hamill, R.L., Haney, M.E., Stamper, M. i Wiley, P.F. (1961) "Tylosin, a new antibiotic: isolation, properties, and preparation of desmycosin, a microbiologically active degradation product". *Antib. and Chemother.* **11**, 328-334.

Hardy, D.J., Hensey, D.M., Beyer, J.M., i Vojtko, C. (1988) "Comparative in vitro activities of new 14- 15- and 16- membered macrolides". *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1710-1719.

Hekman, P. (2001) Programa estadístico para el cálculo del tiempo de espera. Versió WT 1.4. IAP .

Hjorth, N. i Weisman, K. (1973) "Occupational dermatitis among veterinary surgeons caused by spiramycin, tylosin and penethemate". *Acta Derm. Venereol.* **53**, 229-232.

Hjorth, N. i Roed-Petersen, J. (1980) "Allergic contact dermatitis in veterinary surgeons". *Contact Dermatitis.* **6**, 27-29.

Horie, M., Saito, K., Ishii, R., Yoshida, T.H.Y. i Nakazawa, H. (1998) "Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A.* **812**, 295-302.

Houglum, J.E. i Tasler, M.K. (1996) "Liquid chromatographic assay of tylosin in animal feeds". *J. AOAC Int.* **79**, 369-374.

Huber, W.G. (1988) "Aminoglycosides, Macrolides, Lincosamides, Polymyxins, Chloramfenicol and other Antibacterial Drugs". *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 822-848. Booth, N.H. i McDonald, L.E. (Eds.) Ames, Iowa State University Press.

Jenkins, T. (1993) Comunicació personal.

Juhel-Gaugain, M., Anger, B. i Laurentie, M. (1999) "Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection". *J. AOAC Int.* **82**, 1046-1053.

Kanfer, I., Skinner, M.F. i Walker, R.B. (1998) "Analysis of macrolide antibiotics". *J. Chromatogr. A.* **812**, 255-286.

Keng L.J-Y i Boison, J.O. (1992) "High performance liquid chromatographic determination of tylosin in bovine muscle, kidney and liver". *J. Liq. Chromatogr.* **15**, 2025-2034.

Kirst, H. A. (1991) "New macrolides: expanded horizons for an old class of antibiotics". *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 787-790.

Kline, R.M. i Waitt, W.P. (1971) "Tylosin residue analyses in swine tissue". *J. AOAC Int.* **54**, 112-115.

Korkeala, H., Sorvettula, O., Mäki-Petäys, O. i Hirn, J. (1983) "Comparison of different agar diffusion methods for the detection of residues in the kidneys of pigs treated with antimicrobial drugs". *Meat Sci.* **9**, 291-304.

Lampson, B.C., Von David, W. i Parisi, J.T. (1986) "Novel mechanism for plasmid-mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermis*". *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 653-658.

Lauridsen, M.G., Lund, C. i Jacobsen, M. (1988) "Determination and depletion of residues of carbadox, tylosin and virginiamycin in kidney, liver and muscle of pigs in feeding experiments." *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 921-925.

Leal, C., Codony, R., Compañó, R., Granados, M. i Prat, M.D. (2001) "Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography". *J. Chromatogr. A* **910**, 285-290.

Leclerq, R., Derlot, E., Duval, J. i Courvalin, P. (1988) "Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*". *New Engl. J. Med.* **319**, 157-161.

Locke, D., Bush, M. i Carpenter, J.W. (1982) "Pharmacokinetics and tissue concentrations of tylosin in selected avian species". *Am. J. Vet. Res.* **43**, 1807-1810.

Markakis, P.K. (1996) "Microbiological method for determining macrolides in animal feeds in the presence of other drugs by thin-layer chromatography detection". *J. AOAC Int.* **79**, 1263-1268.

Matsuoka, T., Muenster, O.A. i Tonkinson, L. (1980) "Orally administered tylosin for the control of pneumonia in neonatal calves". *Vet. Rec.* **107**, 149-151.

Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A. i Periti, P. (1993) "Chemistry and mode of action of macrolides". *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, suppl. C, 1-9.

McGuire, J.M., Boniece, W.S., Higgens, C.E., Hoehn, M.M., Stark, W.M., Westhead, J. i Wolfe, R.N. (1961) "Tylosin, a new antibiotic I. Microbiological studies". *Antib. and Chemother.* **11**, 320-327.

McOrist, S., Morgan, J., Veehuizen, M.F., Lawrence, K. i Kroger, H.W. (1997) "Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of proliferative enteropathy in pigs". *Am. J. Vet. Res.* **58**, 136-139.

Mediavilla, A. (1997) "Antibióticos macrólidos". *Farmacología humana*, 3a Ed., 1123-1144. Flórez, J., Armijo, J.A. i Mediavilla, A. (Eds) Barcelona, Editorial Masson.

Moats, W.A. (1985a) "Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotic residues in tissues and milk of food-producing animals". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 980-984.

Moats, W.A., Harris, E.W. i Steele, N.C. (1985b) "Comparison of liquid chromatographic and bioassay procedures for determining depletion of intramuscularly injected tylosin". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 413-416.

Montesissa, C., De Liguoro, M., Santi, A., Capolongo, F. i Biancotto, G. (1999) "Tylosin depletion in edible tissues of turkeys". *Food Addit. Contam.* **16**, 405-410.

Nagaraja, T.G., Sun, Y., Wallace, N., Kemp, K.E. i Parrott, C.J. (1999) "Effects of tylosin on concentrations of *Fusobacterium necrophorum* and fermentation products in the rumen of cattle fed a high concentrate diet". *Am. J. Vet. Res.* **60**, 1061-1065.

Nogawa, H., Saito, K., Yamaguchi, N., Tsuchiya, M., Saito, S., Nagura, S., i Yonezawa, S. (1982) "Tylosin residues at the injection site in chickens". *Annu. Rep. Natl. Vet. Assay Lab.* **19**, 33-37.

Nouws, J.F. i Ziv, G. (1977) "Tissue distribution and residues of tylosin in normal and emergency-slaughtered dairy cows and calves". *Arch. Lebensmittelhyg.* **28**, 92-94.

Ose, E.E. i Tonkinson, L.V. (1985) "Comparison of the antimycoplasma activity of two commercially available tylosin premixes". *Poult. Sci.* **64**, 287-293.

Periti, P., Mazzei, T., Mini, E. i Novelli, A. (1989) "Clinical pharmacokinetics properties of the macrolide antibiotics". *Clin. Pharmacokinet.* **16**, 193-214.

Periti, P., Mazzei, T., Mini, E. i Novelli, A. (1992) "Pharmacokinetic drug interactions of macrolides". *Clin. Pharmacokinet.* **23**, 106-131.

Petz, M., Solly, R., Lymburn, M. i Clear, M.H. (1987) "Thin-layer chromatographic determination of erythromycin and other macrolide antibiotics in livestock products". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 691-697.

Plumb, D.C. (1995) *Veterinary Drug Handbook*, 2a Ed., 618-620, Ames, Iowa State University Press.

Prats, C., Francesch, R., Arboix, M. i Pérez, B. (2002) "Determination of tylosin residues in different animal tissues by HPLC". *J. Chromatogr. B.* **766**, 57-65.

Prescott, J.F. (2000) "Lincosamides, macrolides and pleuromutilins". *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3a Ed., 229-262. Prescott, J.F., Baggot, J.D., i Walker, R.D., (Eds.) Ames, Iowa, Iowa State University Press.

Ragheb, H.S., Breunig, H.L., i Scroggs, R.E. (1973) "Comparison of automatic and manual turbidimetric analyses of tylosin in feeds with the plate method". *J. AOAC Int.* **56**, 363-366.

Reese, R.E. i Douglas, R.G. (1987) *Técnicas de laboratorio*, 19-40, Madrid, Díaz de Santos.

Rodvold, K.A. i Piscitelli, S.C. (1993) "New oral macrolide and fluoroquinolone antibiotics: an overview of pharmacokinetics, interactions and safety". *Clin. Infect. Dis.* **17**, 192-199.

Roets, E., Beirinckx, P., Quintens, I. i Hoogmartens, J. (1993) "Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography". *J. Chromatogr.* **630**, 159-166.

Sánchez, A. (2000) "Optimización de la posología antibacteriana (II): metodología para la individualización posológica dual en la práctica clínica". *Pharm Care Esp* **2**, 153-159.

SANCO/1805/2000 (2000) Laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC. Revision of Commission Decision 93/256/EC Directorate General SANCO, Commission of the European Communities.

Saurit, A.R., Rubio, M., Baroni, E., San Andrés, M., Sánchez, S. i Boggio, J.C. (2002) "Some comparative aspects of the pharmacokinetics of tylosin in buffaloes and cattle". *Vet. Res. Commun.* **26**, 49-54.

Schentag, J.J., Ballow, C.H. i Paladino, J.A. (1992) "Dual individualization with antibiotics: integrated antibiotic management strategies for use in hospitals". *Applied Pharmacokinetics*, 3a Ed., 1-20. Evans, W.E., Schentag, J.J. i Jusko, W.J. (Eds.) Vancouver (WA).

Sieck, R.F., Graper, L.K. , Giera, D.D., Herberg, R.J. i Hamill, R.L. (1978) "Tylosin residue study in swine". Lilly Research Laboratories. Greenfield, Indiana. Treball no publicat.

Spivey, J.M. (1992) "The postantibiotic effect". *Clin. Pharmacokinet.* **11**, 865-875.

Spoo, J.W. i Riviere, J.E. (1995) "Chloramphenicol, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones and miscellaneous antibiotics". *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7a Ed., 824-854. Adams, R. (Eds) Iowa, Iowa State University Press.

Sumano, H.S. i Ocampo, L. (1997) "Macrólidos y lincosamidas". *Farmacologia Veterinaria*, 2a Ed., 161-169. McGraw-Hill Interamericana.

Taha, A.A., Elsheikh, H.A., Khalafalla, A.E., Osman, I.A.M. i Abdullah, A.S. (1999) "Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly in desert sheep and nubian goats". *Vet. J.* **158**, 210-215.

Takatsuki, K., Ushizawa, I. i Shoji, T. (1987) "Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring". *J. Chromatogr.* **391**, 207-217.

Tsai, C.-E. i Kondo, F. (2001) "Improved agar diffuson method for detecting residual antimicrobial agents". *J. Food Protect.* **64**, 361-366.

Valdebouze, P., Bozzi, F., Freres, D., i Balland, F. (1970) "Detection of tylosin in pig tissues". *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **10**, 301-308.

Van Bambeke, F. i Tulkens, P.M. (2001) "Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics". *Int. J. Antimicrob. Ag.* **18**, 17-23.

Van Duyn, R.L. i Folkerts, T.M. (1979) "Concentrations of tylosin in blood and lung tissue from calves given single and repeated daily intramuscular doses". *Vet. Med.* 375-377.

Vassilopoulos, V., Kyriakis, S., Spais, A.B., Tsaltas, C., Andreatis, J. i Stoitsiou, C. (1979) "The use of tylosin as a growth promoter in pigs". *Hell. Kteniatr.* 65-78.

Velasco, A. (2003) "Absorción, distribución, biotransformación y eliminación de los fármacos". *Farmacología fundamental*, 13-34. Velasco, A., San Román, L., Serrano, J., Martínez-Sierra, R. i Cadavid, L. (Eds.) McGraw-Hill.

Von-Rosenteil, N.A. i Adam, D. (1995) "Macrolide antibacterials. Drug interactions of clinical significance.". *Drug safety.* **13**, 105-122.

Wagner, J.G. (1993) "Noncompartmental and system analysis". *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist*, Pennsylvania, Technomic Publishing Co, Inc.

Weisel, M.K., Powers, J.D., Powers, T.E. i Baggot, J.D. (1977) "A pharmacokinetic analysis of tylosin in the normal dog". *Am. J. Vet. Res.* **38**, 273-275.

Williams, J.D. i Sefton, A.M. (1993) "Comparison of macrolide antibiotics". *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 11-26.

BIBLIOGRAFIA

Wilson, R.C. (1984) "The macrolides". *Handbook Series in Zoonoses. Section D: Antibiotics, Sulfonamides and Public Health*, Steele, J.H. (Eds.) Boca Raton (FL), CRC Press.

Ziv, G. i Sulman, F.G. (1973) "Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes". *Am. J. Vet. Res.* **34**, 329-333.

Ziv, G., Creveld, C.V., Ben-Zvi, Z., Glickman, A., i Yagil, R. (1995) "Disposition kinetics of tylosin tartrate administered intravenously and intramuscularly to normal and water-deprived camels.". *J. Vet. Pharm. Ther.* **18**, 299-305.

***VIII. ANNEX 1:
MÈTODES ANALÍTICS***

8.1. MÈTODE ANALÍTIC PER A LA DETERMINACIÓ DE LA TILOSINA

8.1.1. Introducció

8.1.1.1. Antecedents

8.1.1.1.1. Mètodes analítics per a la determinació de la tilosina en plasma

Els mètodes analítics existents a la bibliografia per a la determinació de tilosina en plasma són principalment mètodes microbiològics.

Dins d'aquests mètodes, el més utilitzat és el mètode de difusió en gel d'agar, en què s'utilitzen com a agents microbiològics *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) o majoritàriament *Sarcina lutea* (ATCC 9341). Locke i cols. (1982); Burrows i cols., (1986); Ziv i cols. (1995) i Taha i cols. (1999) segueixen el procediment descrit per Bennett i cols. (1966), mentre que Atef i cols. (1991) i Cester i cols. (1993) segueixen el mètode descrit per Arret i cols. (1971).

Altres autors com Ziv i Sulman (1973); Baggot i Gingerich (1976) Gingerich i cols. (1977) o Weisel i cols. (1977) utilitzen el mètode de difusió en gel d'agar amb cilindres inoxidables descrit per Grove i cols. (1955), en què fan servir com a microorganisme test diferents soques de *Sarcina lutea*.

També s'ha descrit un mètode de copa cilíndrica (Arret i cols., 1971) en què s'utilitzà com a microorganisme test *Sarcina lutea* (ATCC 9344), i el

mètode turbidimètric (Ose i Tonkinson, 1985) amb *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144) com a microorganisme test.

També s'ha descrit un mètode de determinació per cromatografia líquida d'alta eficàcia en què les mostres són sotmeses primer a una extracció amb metanol i tampó fosfat (pH 8), seguida d'una purificació amb columnes d'alúmina àcida (Ose i Tonkinson, 1985).

Els mètodes microbiològics mesuren l'activitat antimicrobiana i per tant quantifiquen aquesta activitat per al conjunt dels components de la tilosina, en canvi els mètodes de cromatografia líquida d'alta eficàcia i altres mètodes químics quantifiquen en general el component majoritari de la tilosina (tilosina A).

8.1.1.1.2. Mètodes analítics per a la determinació de tilosina en teixits

En una primera aproximació als mètodes que hi ha descrits, aquests es podrien dividir en dos grans grups tenint en compte la tècnica de determinació que utilitzen; així, es diferenciarien els mètodes microbiològics dels cromatogràfics.

— Mètodes microbiològics

Les primeres anàlisis de la tilosina en mostres provinents de teixits es van dur a terme mitjançant l'ús de mètodes microbiològics (Kline i Waitt, 1971; Van Duyn i Folkerts, 1979; Korkeala i cols., 1983; Moats i cols., 1985b; Petz i cols., 1987; Lauridsen i cols., 1988). Aquests mètodes són bàsicament qualitius, és a dir, són útils per a fer un *screening* de les mostres sospitoses de contenir substàncies antibacterianes, encara que també s'utilitzen per a

quantificar. A la vegada, l'absència de selectivitat, fa difícil confirmar la naturalesa exacta del fàrmac que es troba en els teixits i, per tant, conèixer amb certesa de quin antimicrobià es tracta. Per això, moltes vegades, aquests mètodes s'han utilitzat associats amb diferents tècniques més fines com la cromatografia en capa prima (CCP), d'entre altres (Markakis, 1996).

Els mètodes microbiològics han anat millorant amb el temps, i han optimitzat la seva sensibilitat amb noves combinacions de medis i microorganismes (Tsai i Kondo, 2001).

Hi ha també estudis microbiològics que determinen la presència de tilosina en pinsos animals mitjançant l'anàlisi turbidimètrica (Ragheb i cols., 1973; Coleman, 1988 i Coleman i Mowrey, 1990).

— *Mètodes cromatogràfics*

Davant els inconvenients que presentaven els mètodes microbiològics, es van començar a desenvolupar mètodes per cromatografia líquida d'alta eficàcia (CLAE) que proporcionaven una sensibilitat més alta i, sobretot, una major selectivitat per als diferents components de la tilosina.

La majoria d'aquests mètodes utilitzaren cromatografia en fase reversa juntament amb detecció per UV a 280 o 287 nm (Moats i cols., 1985b; Keng L.J-Y i Boison, 1992; Chan i cols., 1994; Horie i cols., 1998; De Liguoro i cols., 1998; Juhel-Gaugain i cols., 1999; Leal i cols., 2001 i Prats i cols., 2002;). D'entre aquests autors, només Moats i cols. (1985) i Prats i cols. (2002) fan una extracció tipus líquid-líquid, els altres utilitzen tots, una extracció en fase sòlida (EFS), excepte Keng L. J-Y i Boison (1992) i

Juhel-Gaugain i cols. (1999) que utilitzen ambdues purificacions. Aquests mètodes han estat descrits per determinar tilosina en teixits de vacú, porcí i pollastre i el seu límit de detecció oscil·la entre els 5 i els 100 µg/kg. Pel que fa a la fase mòbil, utilitzen fases àcides, més apropiades per a la cromatografia en fase reversa.

La tilosina també s'ha determinat en teixits animals utilitzant cromatografia en capa prima (CCP). Moats, (1985a) utilitzà aquesta tècnica per a determinar tilosina en múscul de pollastre, ous i llet amb uns límits de detecció entre 10 i 100 µg/kg. Petz i cols., (1987) detectà tilosina en múscul, fetge i ronyó de diferents espècies animals i també en ous i llet amb un límit de detecció de 20 µg/kg.

També s'ha utilitzat, la cromatografia líquida juntament amb l'espectrometria de masses (CL-EM) com a mètode alternatiu per a la determinació de nivells residuals de tilosina en múscul de boví amb límits de detecció de 10 µg/kg (Delepine i cols., 1994, 1996); en múscul, fetge i ronyó de boví amb límits de detecció de 30 i 40 µg/kg, respectivament (Draischi i cols., 2001). En teixits de gall d'indi també s'utilitza aquesta tècnica amb un límit de detecció de 50 µg/kg (Montesissa i cols., 1999), o per a la determinació de tilosina en múscul, fetge i ronyó de porc, vedells i pollastres, llet i ous amb límits de detecció entre 1-37 µg/kg (Dubois i cols., 2001). Tots aquests mètodes utilitzen la purificació de les mostres amb columnes d'EFS, després de precipitar les proteïnes, i algun autor també fa servir prèviament la purificació líquid-líquid (Delepine i cols., 1994 i Draischi i cols., 2001).

Hi ha mètodes descrits més sofisticats que utilitzen la cromatografia de gasos en combinació amb l'espectrometria de masses (CG-EM) per a determinar antibiòtics macròlids en múscul de porc i de vacum, però amb un límit de detecció de 50 µg/kg (Takatsuki i cols., 1987).

Altres autors han determinat tilosina en productes farmacèutics amb tècniques com la pirolisi-cromatografia de gasos amb detecció espectrofotomètrica (Danielson i cols., 1993); i altres han aconseguit separar els components de la tilosina mitjançant tècniques de CLAE (Fish i Carr, 1986; Roets i cols., 1993), i encara d'altres han determinat la presència d'antibiòtics en pinsos d'animals per CCP (Markakis, 1996).

Els mètodes d'extracció que es troben descrits a la bibliografia, acostumen a coincidir en un primer pas de desestructuració de la matriu, ja sigui de forma física (trituració) i/o química (dissolvents que causen la precipitació de proteïnes i lípids), seguida d'una basificació o acidificació del medi en virtut del teixit de què es és tracti o bé del mètode de purificació escollit per recuperar la molècula de tilosina. Així, mètodes que utilitzen EFS d'intercanvi iònic (De Liguoro i cols., 1998 i Horie i cols., 1998) o de octadecilsílica (C-18) (Chan i cols., 1994) i teixits com el fetge i el ronyó milloren la recuperació de la tilosina en condicions àcides (Moats, 1985a i De Liguoro i cols., 1998).

8.1.1.2. Validació del mètode analític

La validació de la metodologia analítica utilitzada en els estudis de farmacologia, constitueix la garantia de qualitat i rigorositat dels resultats i conclusions obtingudes. És per això, que és de gran interès l'establiment

d'una metodologia on es defineixin paràmetres fixats com a imprescindibles a l'hora de validar un mètode analític, així com els procediments emprats per a la seva determinació.

8.1.1.2.1. Definicions

Per a la validació de la tècnica s'han calculat els paràmetres següents:

— **Selectivitat i especificitat:** els termes *selectivitat* i *especificitat*, considerats com a equivalents, es defineixen com la capacitat d'un mètode analític per a mesurar exactament i específicament l'analit en presència de tots els components que s'espera que estiguin presents a la mostra. És a dir, ens indica que les impureses, productes de degradació, compostos relacionats, excipients o altres substàncies que estiguin presents en la mostra no interferiran en la determinació de l'analit.

— **Linealitat:** rang de concentració en què els senyals presenten una resposta lineal (directament proporcional a la concentració de l'analit a la mostra). Existeixen però, dos tipus de linealitat:

- **Linealitat intradia,** que és aquella que es calcula en les mateixes condicions, sobre la mateixa mostra, per un mateix analista, en el mateix laboratori, amb els mateixos aparells i reactius i en el curs d'una sèrie d'anàlisis efectuades en un curt interval de temps.
- **Linealitat interdia,** que és la que es calcula sobre una mateixa mostra però en condicions diferents (diferent analista, diferent dia, diferents aparells, etc.).

— **Precisió:** expressa el grau d'acostament entre resultats individuals quan el mètode s'aplica repetidament a múltiples mostres d'una barreja homogènia.

Es poden distingir dos tipus de precisió:

- *Repetibilitat o precisió intradia*, que és la mesura de la precisió d'un mètode efectuat en les mateixes condicions, sobre la mateixa mostra, per un mateix analista, en el mateix laboratori, amb els mateixos aparells i reactius i en el curs d'una sèrie d'anàlisis efectuades en un curt interval de temps.
- *Reproducibilitat o precisió interdia*, és la mesura de la precisió dels resultats d'un mètode analític efectuat sobre una mateixa mostra però en condicions diferents (diferent analista, diferent dia, diferents aparells, etc.).

— **Exactitud:** l'exactitud d'un mètode analític s'expressa com el grau d'acostament entre el valor obtingut i l'acceptat com a valor vertader.

— **Límit de quantificació:** és la concentració més baixa que el mètode pot mesurar amb exactitud i precisió acceptables.

— **Límit de detecció:** és la concentració més baixa d'analit que el mètode pot diferenciar del soroll de fons. És la mínima quantitat d'analit que pot ser detectada en una mostra, però no quantificada com un valor exacte.

— **Estabilitat** de l'analit en la matriu biològica en les condicions d'emmagatzematge: és la comprovació que les condicions

d'emmagatzematge de les mostres no afecten l'analit existent a la matriu biològica.

8.1.1.2.2. Càlcul dels paràmetres

A. Selectivitat i especificitat

La selectivitat d'un mètode analític es determina comparant els resultats de l'anàlisi de mostres que continguin impureses, productes de degradació, substàncies relacionades, excipients o altres substàncies de les mostres problema amb els resultats de l'anàlisi de mostres blanques a les quals se'ls ha afegit els patrons corresponents abans de sotmetre-les al procediment d'extracció.

B. Linealitat

La linealitat del mètode s'avalua mitjançant una anàlisi de regressió de mínims quadrats, en què es representen les concentracions de tilosina en l'eix d'abscisses i les relacions d'àrees entre els pics de l'analit i del patró intern en l'eix d'ordenades.

Es pot considerar que la linealitat d'un mètode és correcta quan el coeficient de correlació està el més pròxim a la unitat i quan les variacions en els pendents de les rectes són mínimes.

C. Precisió

La precisió s'expressa matemàticament per la desviació estàndard (D.E.) o preferiblement pel coeficient de variació (C.V.) dels resultats de les anàlisis d'un nombre suficient d'alíquotes d'una mostra homogènia, fetes en diferents dies.

En aquest estudi i per a avaluar aquest paràmetre en el plasma s'ha utilitzat el mètode de Horwitz. Segons aquest autor, es consideren vàlids els resultats de la determinació de la reproducibilitat d'un mètode quan el C.V. obtingut sigui inferior al valor trobat en aplicar la fórmula següent:

$$C.V. < 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

En què C és la concentració teòrica de l'analit expressada en g/g o g/ml.

Pel que fa a la repetibilitat, es consideren vàlids els resultats de la determinació quan el C.V. corresponent a les mostres analitzades és inferior o es troba dins l'interval 1/2 a 2/3 del valor obtingut en aplicar la fórmula anterior.

Per avaluar la precisió en teixits s'ha calculat el C.V. i s'ha comprovat que aquests paràmetres fossin com a màxim d'un 20 % per a concentracions ≥ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fins a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; d'un 15 % per a concentracions entre 100 i 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Document SANCO/1805/2000).

D. Exactitud

L'exactitud s'expressa en forma d'error relatiu mig (E.R.M.), calculat com la diferència entre el valor trobat i el vertader dividit pel valor vertader (expressat en percentatge), o també pot expressar-se com a percentatge de recuperació de l'analit afegit, és a dir, com la diferència entre la concentració afegida i l'observada després d'extrapolar a una recta de calibratge sotmesa al procediment d'extracció. L'exactitud s'ha avaluat com a error relatiu mig tant per el mètode d'anàlisi en plasma com per el de teixits. Els valors de l'E.R.M. haurien d'estar compresos entre -50 % i + 20 % per a concentracions <1 µg/kg, entre -30 % i +10 % per a concentracions >1 fins a 10 µg/kg i entre -20 % i + 10% per a concentracions ≥10 µg/kg (Document SANCO/1805/2000) i dins d'un ±15 % del valor nominal en el cas que es calculi com a percentatge de recuperació de la quantitat de tilosina afegida en un rang de concentracions (Shah i cols., 1992).

E. Límit de quantificació (LQ)

Es calcula a partir de l'anàlisi de rèpliques de mostres de baixa concentració d'analit amb les quals es determinarà quina és la menor concentració d'analit amb una precisió i exactitud acceptables.

F. Límit de detecció (LD)

Es calcula com la desviació estàndard dels pics més grans dins dels que es consideren soroll de fons d'un nombre determinat de mostres blanques (en cm). El límit de detecció s'avalua segons la fórmula:

$$L.D = 3.3\sigma/S$$

En què 3,3 és el factor corresponent a un nivell de confiança del 99.9 %, σ és la desviació estàndard de les mesures dels senyals obtinguts i S és el pendent mitjà obtingut de la linealitat intradia.

G. Estabilitat

Després d'afegir concentracions conegudes de patrons a mostres blanques, aquestes es sotmeten a les mateixes condicions d'emmagatzematge i com a mínim durant el mateix temps que ho estaran les mostres sotmeses a anàlisi. Passat aquest temps les mostres són analitzades i es comprova que els resultats obtinguts estiguin dins uns marges acceptables tenint en compte la concentració afegida.

8.1.2. Objectius

- Desenvolupar un mètode analític que permeti determinar i quantificar la tilosina en mostres de plasma de les espècies bovina i porcina per CLAE.
- Desenvolupar un mètode analític per a la determinació i quantificació de la tilosina en mostres de teixits diana (múscul, fetge, ronyó, greix i punt d'injecció) provinents de les espècies bovina i porcina amb un límit de quantificació que es correspongui a les exigències de les directives marcades per les autoritats sanitàries europees, és a dir, la meitat de l'LMR.

8.1.3. Material i mètodes

8.1.3.1. Material i mètode analític per a la determinació de tilosina en plasma

8.1.3.1.1. Substàncies utilitzades

- Tilosina (Tilosina base. Lot 940700Y. LABIANA Life Sciences, Terrassa, Barcelona).
- Albendazole (ABZ) (Shering Plough, USA).
- Acetonitril, diclorometà (qualitat CLAE, Riedel-deHaën).
- Etanol 96 % (Panreac).
- Aigua bidestil·lada.
- TRIS (hidroximetilaminometà) (Sigma).
- Hidrogen fosfat sòdic dihidratat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck).
- Àcid ortofosfòric 85 % (per anàlisi, Riedel-deHaën).

8.1.3.1.2. Material de laboratori

- Tubs de vidre de 15 ml (Pyrex).
- Pipetes Pasteur.
- Pipetes automàtiques de precisió de 200 μl i d'1 ml (Gilson).
- Microxeringues de vidre de 25, 50 i 100 μl (Hamilton).
- Tubs de polietilè per a l'injector automàtic (Cole-Palmer).

8.1.3.1.3. Aparells

- Agitador horitzontal (Heidolph PROMAX 1020).
- Vòrtex (Heidolph REAX 2000).
- Centrifugadora (Heraeus SEPATECH).
- Rotavapor (Heidolph ELEKTRO KG).
- Bomba de buit (BUCHI).
- Bomba isocràtica: Waters, 515 CLAE.
- Injector automàtic: Waters 712 Wisp.
- Detector ultraviolat: Waters 486.
- Registrador: Waters 746.

8.1.3.1.4. Solucions patró

a. Solucions patró primàries:

- 1 mg/ml de tilosina: es van pesar 100 mg de tilosina base i es van dissoldre en un matràs aforat de 100 ml amb acetonitril.
- 1 mg/ml de ABZ: es van pesar 100 mg de ABZ i es van dissoldre en un matràs aforat de 100 ml amb metanol.

b. Solucions patró secundàries:

- 0.1 mg/ml de tilosina: 1 ml de la solució primària de tilosina d'1 mg/ml es va dissoldre en 9 ml d'acetonitril.
- 0.01 mg/ml de tilosina: 0.1 ml de la solució primària de tilosina d'1 mg/ml es va dissoldre en 9.9 ml d'acetonitril.

— 0.05 mg/ml de ABZ: 0.5 ml de la solució primària de ABZ d'1 mg/ml de ABZ es va dissoldre en 9.5 ml de metanol.

— 0.005 mg/ml de ABZ: 1 ml de la solució 0.05 mg/ml de ABZ es va dissoldre en 9 ml de metanol.

8.1.3.1.5. Altres solucions

— 1.65 M de TRIS: es van pesar 20 g de TRIS (hidroximetilaminometà) i es van redissoldre en un matràs aforat amb 100 ml d'aigua.

— 0.05 M d'hidrogen fosfat sòdic dihidratat: es van pesar 4.4 g d'hidrogen fosfat sòdic i es van redissoldre en 500 ml d'aigua. Per a la preparació de la fase mòbil es portà la solució a pH 2.4 amb àcid ortofosfòric 85 %.

8.1.3.1.6. Condicions cromatogràfiques

— Fase mòbil: acetonitril/0.05 M d'hidrogen fosfat sòdic dihidrat a pH 2.4. Proporció (37 %:63 %).

— Columna: ODS-2; 5 µg (4.6 x 200 mm), (Waters).

— Flux: 1.5 ml/min.

— Detecció per ultraviolat: λ de 280 nm.

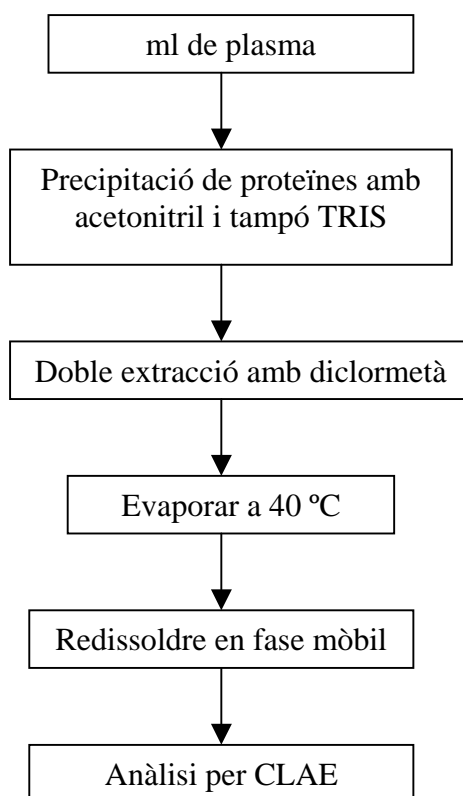
8.1.3.1.7. Procediment d'extracció de la tilosina en mostres de plasma

Es van prendre 0.5 ml de plasma de les diferents mostres i es van col·locar en tubs de vidre, amb tap de rosca, de 15 ml de capacitat. S'hi afegiren 0.125 µg de ABZ (25 µl de la solució 0.005 mg/ml com a patró intern) més 0.5 ml de tampó TRIS 1.65 M (pH 10.8). A continuació s'afegiren 4 ml d'acetonitril per precipitar les proteïnes, s'agità durant 30 s al vòrtex i es

centrifugà a 1932 g. Es recollí el sobrenedant i es col·locà el contingut en tubs de 30 ml, on s'hi afegiren 10 ml de diclorometà. S'agità en un agitador horitzontal durant 20 min, passats els quals, es centrifugà a 1932 g durant 20 min. Es repetí l'extracció amb 5 ml més de diclorometà i es transferí la fase orgànica a tubs cònics per portar a sequedat mitjançant l'ús d'un rotavapor a 40 °C. Aquest extracte sec es va redissoldre en 200 µl de fase mòbil dels quals 50 µl s'injectaren al cromatògraf per a la seva separació i quantificació.

A la figura 35 es pot veure representat l'esquema del procediment d'extracció que es va seguir en l'anàlisi de les mostres de plasma.

Figura 35. Esquema del procediment d'extracció de la tilosina en mostres de plasma.



8.1.3.2. Validació del mètode analític de la tilosina en plasma**8.1.3.2.1. *Selectivitat i especificitat***

Per determinar si el mètode emprat era selectiu i específic es van comparar els resultats de l'anàlisi de mostres de plasma blanques amb mostres de plasma blanques a les quals se'ls hi afegí tilosina i ABZ, abans de ser processades.

8.1.3.2.2. *Linealitat*

L'estudi de la linealitat es va fer intradia i interdia per a les mostres de plasma de ambdues espècies (vedells i porcs).

Per calcular la linealitat intradia del mètode es van prendre 5 alíquotes de 0.5 ml de plasma blanc a les quals se'ls se li afegiren concentracions conegudes de tilosina (0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 µg/ml) i de ABZ (0.25 µg/ml). Les mostres van ser processades per quadruplicat d'acord amb segons el procediment descrit a l'apartat 8.1.3.1.7.

Simultàniament es van preparar blancs de plasma per comprovar que no hi havia cap pic en el temps de retenció de la tilosina que pogués interferir en la quantificació correcta d'aquesta.

La linealitat interdia es va realitzar de la mateixa manera que la linealitat intradia, però les mostres de la recta es van analitzar en dies diferents.

Per al càlcul de les dues linealitats es va procedir com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.B

8.1.3.2.3. Precisió i exactitud

Per calcular la precisió i l'exactitud intradia del mètode es van prendre 5 alíquotes de 0.5 ml de plasma a les quals se'ls afegiren concentracions conegudes de tilosina (0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 µg/ml) i de ABZ (0.125 µg). Les mostres van ser processades i analitzades per quadruplicat d'acord amb el procediment descrit a l'apartat 8.1.3.1.7.

La precisió i l'exactitud interdia es va realitzar igual que la intradia, però les mostres van ser analitzades en 4 dies diferents.

Els càlculs de la precisió i de l'exactitud es van realitzar com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.C i 8.1.1.2.2.D.

8.1.3.2.4. Límit de quantificació

El límit de quantificació es va determinar afegint 0.08 µg/ml (80 µl de la solució 0.001 µg/µl) de tilosina i 0.125 µg de ABZ, a 4 mostres blanques que van ser analitzades segons el procediment descrit a l'apartat 8.1.3.1.7. i de les quals es va calcular la precisió (mesurada com a coeficient de variació) i l'exactitud interdia (mesurada com a error relatiu mig) corresponent a la concentració afegida, com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.C. i 8.1.1.2.2.D.

8.1.3.2.5. Límit de detecció

Per calcular-lo es van preparar 10 mostres blanques d'acord amb el procediment d'extracció descrit a l'apartat 8.1.3.1.7., es va mesurar de cada mostra el pic més gran dins dels que es consideraren soroll de fons, i se'n va calcular la desviació estàndard. El valor del límit de detecció va ser calculat d'acord amb la fórmula descrita a l'apartat 8.1.1.2.2.F.

8.1.3.2.6. Estabilitat

Per comprovar l'estabilitat de la tilosina en la matriu biològica, i mantingudes en les condicions d'emmagatzematge, es van prendre 6 mostres de plasma a les quals se'ls va afegir una concentració coneguda de tilosina (1 µg/ml) i seguidament van ser congelades en les mateixes condicions que les mostres problema (-80 °C).

Les mostres van ser descongelades a diferents temps coincidents amb el temps que portaven congelades les mostres problema abans de ser analitzades. Les mostres es van analitzar després d'1, 2 i 3 mesos de ser emmagatzemades.

L'estabilitat es va calcular com es detalla a l'apartat 8.1.1.2.2.G.

8.1.3.3. Material i mètode analític per a la determinació de la tilosina en teixits*8.1.3.3.1. Substàncies utilitzades*

- Tilosina (Tilosina base. Lot 940700Y. LABIANA Life Sciences, Terrassa, Barcelona).
- ABZ (Shering Plough, USA).
- Acetonitril, acetat d'etil i metanol (qualitat CLAE, Riedel-deHaën).
- Triclorometà, diclorometà i àcid ortofosfòric 85 % (per anàlisi, Riedel-deHaën).
- Hidròxid sòdic (Riedel-deHaën).
- Aigua bidestil·lada.
- Hidrogen fosfat sòdic dihidratat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (Merck).
- Dihidrògen fosfat potàsic (KH_2PO_4), (Merck).

8.1.3.3.2. Material de laboratori

- Tubs de vidre de 30 ml (Pyrex).
- Pipetes Pasteur.
- Pipetes automàtiques de precisió de 200 μl , 1 i 5 ml (Gilson).
- Microxeringues de vidre de 25, 50 i 100 μl (Hamilton).
- Tubs de polietilè per a l'injector automàtic (Cole-Palmer).
- Pinces, tisores.

8.1.3.3.3. Aparells

- Balança de precisió (Sartorius).
- Homogenitzador ultraturrax(Heidolph DIAX 900).
- Agitador horitzontal (Heidolph PROMAX 1020).
- Vòrtex (Heidolph REAX 2000).
- Centrifugadora (Heraeus SEPATECH).
- Speed-Vac (Savant Instruments SC110A Speedvac plus concentrator).
- Rotavapor (Heidolph ELEKTRO KG).
- Bomba de buit (BUCHI).
- Cromatògraf líquid d'alta eficàcia:
 - Bomba: Waters, 515 CLAE.
 - Injector: Waters 712 Wisp.
 - Detector ultraviolat: Waters 486.
 - Registrador: Waters 746.

8.1.3.3.4. Solucions patró

Les solucions patró utilitzades van ser les mateixes que les descrites a l'apartat 8.1.3.1.4.

8.1.3.3.5. Altres solucions

- NaOH 50 % : es van pesar 50 g de NaOH i es van enrasar amb aigua destil·lada fins a 100 ml.
- NaOH 7 M: es van pesar 14 g de NaOH i es van enrasar amb aigua destil·lada fins a 50 ml.

— Tampó fosfat 0.07 M, pH 8.5: 1.18 g de Na_2HPO_4 i 0.9 g de KH_2PO_4 es van dissoldre en 100 ml d'aigua cadascun. Es van prendre 94.5 ml de la solució sòdica junt amb 5.5 ml de la potàssica.

— Hidrògen fosfat sòdic dihidratat 0.05 M: es van pesar 4.4 g d'hidrògen fosfat sòdic i es van redissoldre en 500 ml d'aigua. Per a la preparació de la fase mòbil es portà la solució a pH 2.4 amb àcid ortofosfòric 85 %.

8.1.3.3.6. Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques van ser les mateixes que s'han especificat a l'apartat 8.1.3.1.6., amb excepció de la proporció de la fase mòbil: acetonitril/0.05 M d'hidrògen fosfat sòdic dihidrat a pH 2.4 (33 %:66 %).

8.1.3.3.7. Procediment d'extracció de la tilosina en mostres de teixits

El procediment d'extracció utilitzat va ser similar per al múscul, el fetge i el ronyó de vedells i porcs, amb una lleugera variació en el cas del greix de vedell i el greix+pell de porc.

a. Múscul, fetge i ronyó

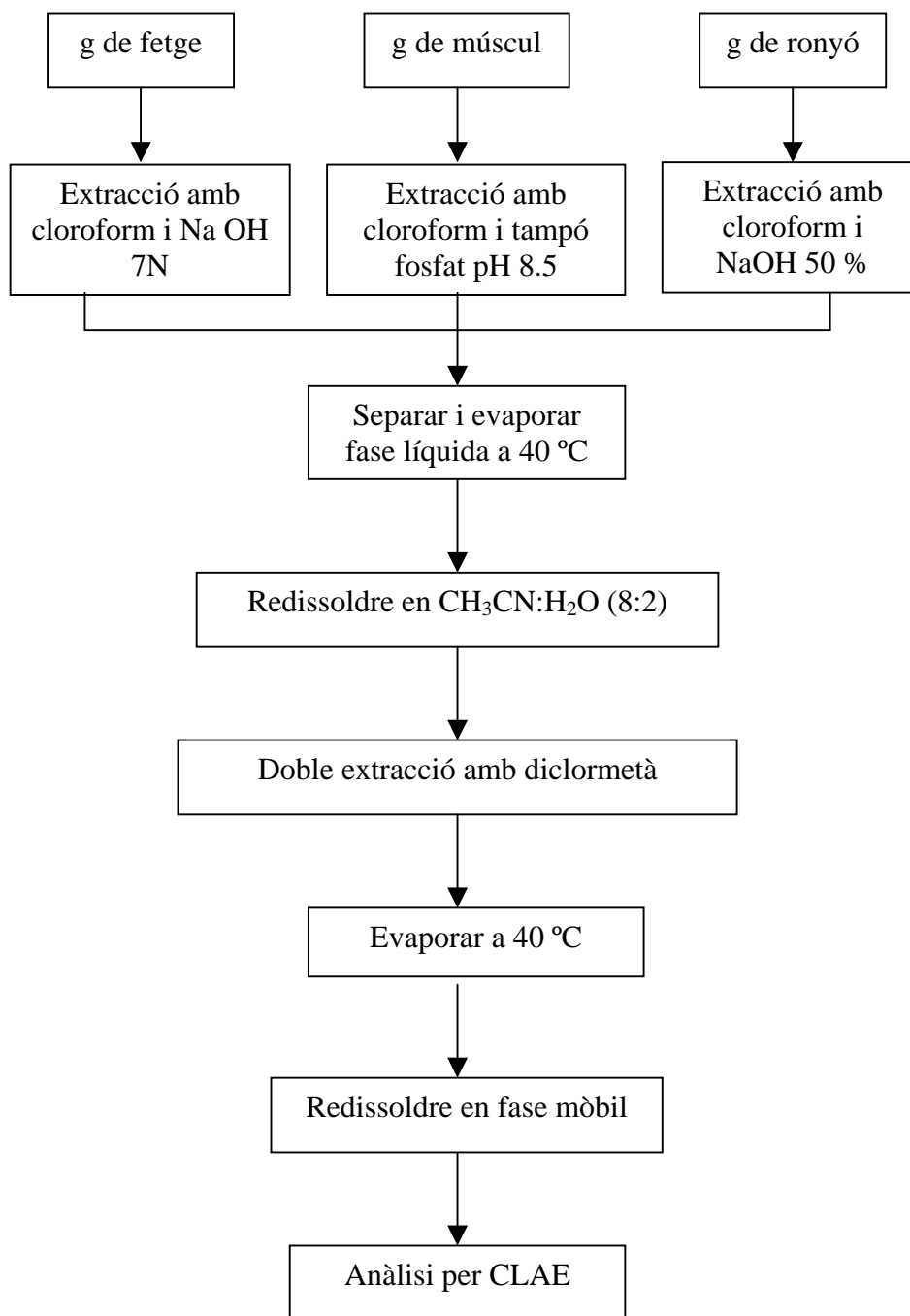
Es varen pesar 5 g de múscul i es van col·locar dins de tubs de vidre amb tap de rosca de 30 ml de capacitat. S'hi afegiren 3 μg de ABZ (30 μl de la solució 0.1 mg/ml), com a patró intern, juntament amb 10 ml de cloroform i 1 ml de tampó fosfat (Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 0.07 M, pH: 8.5). Seguidament les mostres van ser homogeneïtzades amb l'ajut d'un homogenitzador (ultraturrax). Després van ser agitades durant 20 min en un agitador horitzontal i centrifugades durant 20 min més a 1932 g. Es procedí a recollir

el cloroform en tubs de 15 ml i a secar-lo mitjançant un Speed-Vac a 40 °C. Els extractes secs obtinguts van ser redissolts en 4 ml d'acetonitril:aigua (8:2), i sotmesos a una extracció líquid-líquid amb 10 ml de diclorometà. Després d'agitar i centrifugar durant 10 min, es va recollir la fase orgànica i es va fer una segona extracció amb 5 ml de diclorometà. Tot el diclorometà recollit va ser evaporat mitjançant un rotavapor a 40 °C. Finalment, els extractes secs van ser redissolts en 200 µl de fase mòbil, dels quals 50 µl van ser injectats en el cromatògraf per a la seva separació i quantificació.

Les mostres de fetge i ronyó van ser processades de la mateixa manera que en el cas del múscul, però en comptes d'afegir tampó fosfat (Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 0.07 M, pH: 8.5) al començament de l'extracció, s'hi va afegir 1 ml de NaOH 7 N en el cas del fetge, i 1 ml de NaOH 50 % en el cas del ronyó. El mateix procediment fou utilitzat per a l'extracció de múscul, fetge i ronyó de vedell i de porc, tot i que només es va validar de forma completa per a una espècie (vedell).

A la figura 36 es poden veure esquematitzats els passos que es van seguir en l'extracció de la tilosina de les mostres de múscul, fetge i ronyó.

Figura 36. Esquema del procediment d'extracció de la tilosina en mostres de múscul, fetge i ronyó.



b. Pell+greix de porc

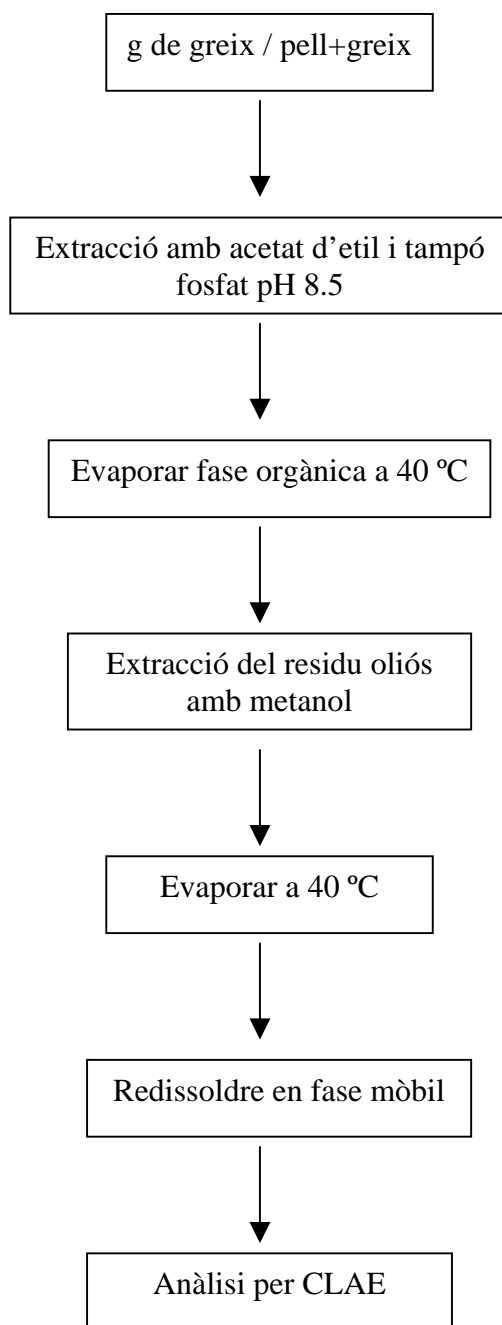
Es van pesar 5 g de pell+greix i es col·locaren dins un tub de 30 ml de capacitat. Seguidament, s'hi afegiren 2 ml de tampó fosfat (Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 0.07 M, pH: 8.5) i 10 ml d'acetat d'etil. No es va afegir patró intern en aquest teixit. Després d'homogeneïtzar el teixit, les mostres van ser agitades i centrifugades a 1932 g durant 20 min. Es va descartar la fase aquosa i la fase orgànica es va evaporar fins a quedar un residu oliós d'aproximadament 3 ml de volum. S'hi afegiren 4 ml de metanol i les mostres s'agitaren i es centrifugaren durant 10 min. Després el metanol es mesurà i s'evaporà fins a la sequedat. El residu sec es va redissoldre en 200 μl de fase mòbil dels quals 50 μl van ser injectats en el cromatògraf per a la seva anàlisi.

c. Greix de vedell

El procediment utilitzat en greix de vedell va ser el mateix que el descrit per a pell+greix de porc, però enlloc d'afegir-hi 10 ml d'acetat d'etil, se n'hi van afegir 15 ml.

A la figura 37 es pot veure representat en forma d'esquema el procediment d'extracció emprat per extreure la tilosina de mostres de teixit de greix i de pell+greix.

Figura 37. Esquema del procediment d'extracció de la tilosina en mostres de greix i de pell+greix.



8.1.3.4. Validació del mètode analític de la tilosina en teixits*8.1.3.4.1. Selectivitat i especificitat*

L'especificitat del mètode es va avaluar a partir de la comparació de la matriu biològica analitzada a la qual s'hi afegí una concentració coneguda de tilosina i de ABZ abans de ser processades, amb un blanc de la mateixa matriu. Es comprovà que no apareixia cap pic en el mateixos temps de retenció que la tilosina i que l'ABZ.

8.1.3.4.2. Linealitat

L'estudi de la linealitat es va fer interdia i intradia per a cadascun dels teixits analitzats.

Per a l'estudi intradia, es van preparar per quadruplicat 4 mostres de cada una de les matrius biològiques per analitzar i se'ls afegí una concentració creixent de tilosina (50, 100, 250 i 500 µg/kg per múscul i ronyó; 50, 100, 200 i 300 µg/kg per al fetge i pell+greix de porc i 50, 100, 200 i 400 µg/kg per a greix de vedell).

A totes les mostres se'ls va afegir 3 µg de ABZ (30 µl de la solució de 0.1 mg/ml).

Alhora es van preparar blancs de cadascun dels teixits per comprovar que no hi havia cap pic en el temps de retenció de la tilosina que pogués interferir en la correcta quantificació d'aquesta.

Les mostres van ser sotmeses al procediment d'extracció descrit als apartats 8.1.3.3.7. a, b i c i van ser analitzades per CLAE segons les condicions de l'apartat 8.1.3.3.6.

La linealitat interdia es va realitzar de la mateixa manera que la linealitat intradia, però les mostres de la recta es van analitzar en 4 dies diferents.

Per al càlcul de les dues linealitats es va procedir com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.B.

8.1.3.4.3. Precisió i exactitud

L'estudi de la precisió i de l'exactitud es va fer interdia i intradia per a cadascun dels teixits analitzats.

Per calcular la precisió i l'exactitud intradia del mètode, es van afegir per a cadascun dels teixits estudiats quatre concentracions diferents de tilosina (les mateixes que per al càlcul de la linealitat, descrites ja a l'apartat 8.1.3.4.2.). Les mostres es van processar per quadruplicat i es van analitzar d'acord amb les condicions descrites anteriorment.

La precisió i l'exactitud interdia es van realitzar igual que la intradia, però les mostres van ser analitzades en 4 dies diferents.

Els càlculs de la precisió i de l'exactitud es van realitzar com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.C. i 8.1.1.2.2.D.

8.1.3.4.4. Límit de quantificació

Per calcular el límit de quantificació es van preparar 4 mostres de cadascuna de les matrius estudiades, a les quals s'hi van afegir concentracions conegudes de tilosina i de ABZ de 50 µg/kg i 3 µg (30 µl de la solució de 0.1 mg/ml), respectivament.

Les mostres varen ser processades d'acord amb les diferents metodologies descrites als apartats 8.1.3.3.7. a, b i c i es van calcular la precisió i l'exactitud interdia per a la concentració afegida.

També es va avaluar el límit de quantificació calculant la mitjana del coeficient de variació obtingut en dos dies diferents, procedent de l'anàlisi de 10 mostres de cadascun dels teixits a les quals se'ls havia afegit 50 µg/kg de tilosina.

El càlcul del límit de quantificació es va fer com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.E.

8.1.3.4.5. Límit de detecció

Per calcular-lo es van preparar 10 mostres blanques de cadascun del teixits estudiats i es van sotmetre al procediment d'extracció descrit a l'apartat 8.1.3.3.7. a, b i c. Es va mesurar de cada mostra el pic més gran dins dels que es consideraren soroll de fons, i se'n va calcular la desviació estàndard.

L'LD va ser calculat d'acord amb la fórmula descrita a l'apartat 8.1.1.2.2.F.

8.1.3.4.6. Estabilitat

Per comprovar l'estabilitat de la tilosina en les diferents matrius biològiques, i mantingudes en les condicions d'emmagatzematge, es van prendre 6 mostres de cadascun dels teixits, als quals s'hi va afegir una concentració coneguda de tilosina (250 µg/kg) i seguidament van ser congelades en les mateixes condicions que les mostres problema (-80 °C).

Les mostres van ser descongelades en diferents temps coincidents amb el temps transcorregut des de la congelació fins a l'anàlisi de les mostres problema. Les mostres es van analitzar després de 80 dies, en el cas de les mostres de múscul; 120 dies, en el cas del fetge; 110 dies, en el cas del greix, i 400 dies, en el cas del ronyó.

L'estabilitat es va calcular com s'especifica a l'apartat 8.1.1.2.2.G.

8.1.4. Resultats

8.1.4.1. Validació del mètode analític de la tilosina en plasma

Per a l'estudi de la validació del mètode analític de tilosina en plasma es va utilitzar plasma de vedell, donat que totes dues matrius no mostraren diferències alhora de ser analitzades cromatogràficament.

8.1.4.1.1. Selectivitat i especificitat

A la figura 38 es mostren els cromatogrames corresponents a una mostra de plasma blanc de vedell i a una mostra de plasma a la qual s'havia afegit tilosina i ABZ.

Els temps de retenció per a la tilosina fou de 3.6 ± 0.12 min i de $4.6.1 \pm 0.06$ min per a l'ABZ.

En comparar ambdós cromatogrames no s'observà cap interferència cromatogràfica en els temps de retenció corresponents als analits afegits.

Figura 38. Cromatogrames corresponents a una mostra de plasma blanc de vedell (a) i a una mostra de plasma a la qual s'ha afegit 500 ng de tilosina i 125 ng de ABZ (b).

8.1.4.1.2. Linealitat

Les taules 25 i 26 mostren els resultats de la linealitat intradia i interdia respectivament.

Taula 25. Linealitat intradia del mètode analític per a la determinació de tilosina en plasma de vedell (n = 4).

<i>Ordenada a l'origen</i> <i>(a)±D.E.</i>	<i>Pendent</i> <i>(b)±D.E.</i>	<i>Coefficient de correlació</i> <i>(r)±D.E.</i>
0.17±0.11	3.98±0.58	0.9989±0.001

Taula 26. Linealitat interdia del mètode analític per a la determinació de tilosina en plasma de vedell (n = 4).

<i>Ordenada a l'origen</i> <i>(a)±D.E.</i>	<i>Pendent</i> <i>(b)±D.E.</i>	<i>Coefficient de correlació</i> <i>(r)±D.E.</i>
0.12±0.06	3.01±0.65	0.9988±0.002

Com s'observa a les taules, tant per a la linealitat intradia com interdia el coeficient de correlació del mètode fou proper a 1. Els pendents de les dues linealitats van ser similars, cosa que indica una sensibilitat aproximadament igual del mètode quan s'avaluà aquest paràmetre el mateix dia o en dies diferents. El mètode fou lineal dins del rang de concentracions de 0.25 i 5 µg/ml.

8.1.4.1.3. Precisió i exactitud

Els resultats de la precisió i l'exactitud intradia i interdia del mètode per a la tilosina es poden veure a la taula 27 i a la taula 28, respectivament.

Taula 27. Precisió i exactitud intradia del mètode analític per a la determinació de tilosina en plasma de vedell (n = 4).

	<i>µg Tilosina teòrics</i>				
	0.125	0.25	0.5	1.25	2.5
µg de Tilosina observats	0.14	0.25	0.50	1.23	2.51
D.E.	0.01	0.02	0.04	0.03	0.01
C.V. (%)	7.14	8.0	8.0	2.44	0.4
E.R.M. (%)	12.0	0	0	-1.6	0.4

Taula 28. Precisió i exactitud interdia del mètode analític per a la determinació de tilosina en plasma de vedell (n = 4).

	<i>µg Tilosina teòrics</i>				
	0.125	0.25	0.5	1.25	2.5
µg de Tilosina observats	0.11	0.25	0.52	1.24	2.50
D.E.	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
C.V. (%)	9.09	8	1.92	1.61	0.4
E.R.M. (%)	-12	0	4	-0.8	0

Després d'aplicar la fórmula de Horwitz, es veu que els resultats de la precisió intradia i interdia es van trobar dins dels límits permesos per al rang de concentracions assajat.

Els resultats obtinguts de l'E.R.M. es van trobar dins dels intervals suggerits en Document SANCO/1805/2000 per a les diferents concentracions i per tant l'exactitud intradia i interdia del mètode, avaluat a través de l'E.R.M van ser correctes.

8.1.4.1.4. Límit de quantificació

Segons els resultats, que es poden veure a la taula 29, en els quals la precisió i l'exactitud estan dins els límits fixats, el límit de quantificació per a la tilosina es va establir en 0.08 ($\mu\text{g/ml}$).

Taula 29. Límit de quantificació de tilosina en plasma de vedell.

$\mu\text{g/ml}$ Tilosina afegits	C.V. (%)	E.R.M. (%)
0.08	9.33	-0.125

8.1.4.1.5. Límit de detecció

A la taula 30 es mostren els resultats del límit de detecció del mètode.

Taula 30. Límit de detecció de la tilosina en plasma de vedell ($n = 10$).

Resposta Mitjana (cm)	σ	S	L.D. ($\mu\text{g/ml}$)
0.185	0.067	3.98	0.05

8.1.4.1.6. Estabilitat

A la taula 31 es mostren els resultats obtinguts de la prova d'estabilitat de l'analit.

Taula 31. Estabilitat de la tilosina en plasma segons les condicions d'emmagatzematge.

Concentració afegida ($\mu\text{g/ml}$)	Concentració observada ($\mu\text{g/ml}$) \pm D.E.
1	0.087 \pm 0.023

Els resultats trobats en el plasma analitzat demostraren que la tilosina en les condicions d'emmagatzematge és estable.

8.1.4.2. Validació del mètode analític de la tilosina en teixits

Per a l'estudi de la validació en les diferents matrius biològiques es van utilitzar els teixits de l'espècie bovina, excepte per a l'estudi de la selectivitat i de l'especificitat, en els que es van utilitzar les matrius corresponents a les diferents espècies. En el cas del greix el mètode es va validar per a cadascuna de les espècies objectes de l'estudi.

8.1.4.2.1. Selectivitat i especificitat

En les figures 39 a 46 es mostren els cromatogrames de teixits blancs corresponents a cadascuna de les espècies objecte d'aquest estudi i a mostres dels mateixos teixits als quals se'ls ha afegit ambdós analits estudiats.

Els temps de retenció van ser de 4.85 ± 0.22 min per a la tilosina i de 5.45 ± 0.27 min per a l'ABZ.

No s'observà cap interferència cromatogràfica en els temps de retenció corresponents a la tilosina i a l'ABZ.

(a)

(b)

Figura 39. Cromatogrames corresponents a una mostra de múscul de vedell blanc (a) i a una mostra de múscul a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ (b).

(a)

(b)

Figura 40. Cromatogrames corresponents a una mostra de fetge de vedell blanc (a) i a una mostra de fetge a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ (b).

(a)

(b)

Figura 41. Cromatogrames corresponents a una mostra de ronyó de vedell blanc (a) i a una mostra de ronyó a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ(b).

(a)

(b)

Figura 42. Cromatogrames corresponents a una mostra de greix de vedell blanc (a) i a una mostra de greix a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina (b).

(a)

(b)

Figura 43. Cromatogrames corresponents a una mostra de múscul de porc blanc (a) i a una mostra de porc a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ (b).

(a)

(b)

Figura 44. Cromatogrames corresponents a una mostra de fetge de porc blanc (a) i a una mostra de fetge a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ (b).

(a)

(b)

Figura 45. Cromatogrames corresponents a una mostra de ronyó de porc blanc (a) i a una mostra de ronyó a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina i 3000 ng de ABZ (b).

(a)

(b)

Figura 46. Cromatogrames corresponents a una mostra de pell+greix de porc blanc (a) i a una mostra de pell+greix a la qual s'han afegit 500 ng de tilosina (b).

8.1.4.2.2. Linealitat

A les taules 32 i 33 es mostren els resultats de la linealitat intradia i interdia per cadascun dels teixits.

Taula 32. Linealitat intradia per a cadascun dels diferents teixits analitzats (n = 4).

<i>Teixit</i>	<i>Ordenada a l'origen (a) ±D.E.</i>	<i>Pendent (b) ±D.E.</i>	<i>Coefficient de correlació (r) ±D.E.</i>
Múscul	0.17±0.11	9.87±0.82	0.9922±0.007
Fetge	0.07±0.03	3.62±0.10	0.9973±0.002
Ronyó	0.17±0.03	1.48±0.22	0.9921±0.006
Pell+greix porc	0.47±0.59	7.13±2.53	0.9950±0.001
Greix vedell	0.17±0.15	8.12±1.49	0.9970±0.003

Taula 33. Linealitat interdia per a cadascun dels diferents teixits analitzats (n = 4).

<i>Teixit</i>	<i>Ordenada a l'origen (a) ±D.E.</i>	<i>Pendent (b) ±D.E.</i>	<i>Coefficient de correlació (r) ±D.E.</i>
Múscul	0.09±0.05	5.2±2.48	0.9958±0.007
Fetge	0.04±0.04	2.56±1.18	0.9927±0.005
Ronyó	0.13±0.10	2.24±2.50	0.9946±0.005
Pell+greix porc	0.35±0.08	7.68±3.85	0.9934±0.005
Greix vedell	0.59±0.14	4.54±0.27	0.9981±0.001

La linealitat es va establir entre 50 i 500 µg/kg per a múscul i ronyó, entre 50 i 300 µg/kg per al fetge i per a pell+greix de porc, i entre 50 i 400 µg/kg per al greix de vedell.

8.1.4.2.3. Precisió i exactitud

La taula 34 mostra els resultats de la precisió i de l'exactitud trobades per a cadascun dels teixits.

Taula 34. Precisió i exactitud dels mètodes de determinació de tilosina en els diferents teixits estudiats (n = 4).

Teixit	<i>Tilosina afegida</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>Tilosina trobada</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>Exactitud (E.R.M)</i> (%)	<i>Precisió (C.V.)</i> (%)
Múscul	50	57	+14	13.1
	100	99	-1	11.5
	250	236	-5.6	11.2
	500	505	+1	2.1
Fetge	50	47	-6	12.0
	100	103	+3	8.9
	200	198	-1	10.4
	300	298	-0.7	3.8
Ronyó	50	48	-4	34
	100	108	+8	20
	250	259	+3.6	4.9
	500	491	-1.8	1.9
Greix vedell	50	50	0	20.3
	100	90	-10	9.3
	200	180	-10	3.9
	400	410	+2.5	0.9
Pell+greix porc	50	42	-16	19.4
	100	105	+5	11.4
	200	199	-0.5	7.2
	300	293	-2.3	2.4

La precisió i l'exactitud obtingudes en la gran majoria de les diferents concentracions assajades van estar per sota dels límits establerts per la Comunitat Europea (Document SANCO/1805/2000). Cal remarcar, però, que la precisió i l'exactitud corresponents a la concentració de l'LMR en tots els teixits va estar sempre per sota dels límits establerts.

8.1.4.2.4. Límit de quantificació

A les taules 35 i 36 es mostren els resultats obtinguts del límit de quantificació.

Taula 35. Límit de quantificació de la tilosina obtingut en els diferents teixits.

<i>Teixit</i>	<i>Tilosina afegida</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>C.V. (%)</i>	<i>E.R.M. (%)</i>
Múscul	50	13.1	+14
Fetge	50	12.0	-6
Ronyó	50	34.0	-4
Pell+greix porc	50	19.4	-16
Greix vedell	50	20.3	0

La precisió i l'exactitud obtingudes en la majoria dels teixits fou bona. En el ronyó tot i que la precisió trobada va ser més elevada del que s'esperava, els resultats foren molt homogenis. Com es pot veure a la taula 36 el C.V. dels valors trobats disminuï en avaluar la variació obtinguda a l'afegir aquesta concentració i analitzar-la en dies diferents.

Això explicaria que el C.V. tant alt obtingut en els diferents teixits, sobretot en el ronyó no depèn de la concentració afegida sino a les diferents condicions a les que es sotmet la matriu i que varien al llarg del dia alhora de fer l'anàlisi dins d'un mateix dia.

Taula 36. Límit de quantificació de la tilosina obtingut per als diferents teixits i avaluat com el C.V. corresponent a diferents dies d'anàlisi.

<i>Teixit</i>	<i>Tilosina afegida</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>C.V.(%)\pmD.E.</i>
Múscul	50	11.5 \pm 2.2
Fetge	50	14.65 \pm 0.21
Ronyó	50	17.04 \pm 7.49
Pell+greix porc	50	16.11 \pm 3.71
Greix vedell	50	13.73 \pm 1.36

El límit de quantificació per a la tilosina es va establir en 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

8.1.4.2.5. Límit de detecció

A la taula 37 es mostren els límits de detecció resultants per a cadascun dels diferents teixits objecte de l'estudi.

Taula 37. Límit de detecció de la tilosina per als diferents teixits estudiats (n = 10).

<i>Teixit</i>	<i>Resposta</i> <i>Mitjana (cm)</i>	σ	<i>S</i>	<i>LD</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Múscul	0.17	0.053	9.87	18
Fetge	0.15	0.035	3.62	32
Ronyó	0.19	0.015	1.48	34
Pell+greix porc	0.2	0.045	7.13	21
Greix vedell	0.13	0.049	8.12	20

Els límits de detecció per a la tilosina en els diferents teixits es va establir en 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per al múscul, 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per al fetge, 34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per al ronyó, 21 per al pell+greix de porc i 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per al greix de vedell.

8.1.4.2.6. Estabilitat

A la taula 38 es mostren els resultats obtinguts de la prova d'estabilitat de l'analit en els diferents teixits.

Taula. 38. Estabilitat de la tilosina en els diferents teixits estudiats.

<i>Teixit</i>	<i>Concentració afegida</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>Concentració observada</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm D.E.
Múscul	250	235 \pm 0.023
Fetge	250	238 \pm 0.036
Ronyó	250	252 \pm 0.012
Pell+greix porc	250	248 \pm 0.031
Greix vedell	250	224 \pm 0.024

Els resultats trobats en tots els teixits analitzats demostraren una bona estabilitat de la tilosina en les condicions d'emmagatzematge.

8.1.5. Discussió

8.1.5.1. Mètode analític per a la determinació de la tilosina en plasma

El mètode utilitzat que es basa en una desproteïnitzaació del plasma a pH bàsic seguida d'una purificació de la molècula de tilosina amb diclorometà. És un mètode senzill i ràpid amb una bona sensibilitat, resolució i selectivitat, que permet la quantificació de tilosina en concentracions iguals o superiors a 0.08 µg/ml.

En el mètode cromatogràfic descrit per (Ose i Tonkinson, 1985) també es fa una extracció a pH bàsic però s'utilitza metanol enlloc d'acetonitril, es purifica amb columnes d'alúmina àcida en comptes de fer-ho amb dissolvents orgànics. La detecció en ambdós mètodes és per UV (280 nm), però en l'estudi realitzat per aquest autor s'utilitza una fase mòbil amb par iònic, cosa que normalment provoca més variabilitat en l'estabilització de les condicions cromatogràfiques i dona lloc a uns temps de retenció variables.

8.1.5.2. Mètode analític per a la determinació de la tilosina en teixits

El mètode d'extracció descrit en el present treball, va permetre l'anàlisi de la tilosina en tots els teixits diana provinents de les dues espècies animals objecte d'aquest estudi. Únicament unes petites variacions del mètode van ser necessàries per a l'anàlisi de les diferents matrius biològiques.

Per les característiques químiques de la molècula (pKa:7.1), les condicions de pH que normalment s'utilitzen són bàsiques (Petz i cols., 1987; Takatsuki

i cols., 1987; Keng L.J-Y i Boison, 1992; Delepine i cols., 1996; Draisci i cols., 2001), ja que és així com la tilosina es troba en forma no ionitzada i és susceptible de ser separada del teixit i arrossegada pel solvent en el qual es troba immersa la matriu. Alguns autors, però, en fan l'extracció a pH àcid; en primer lloc, per trencar l'estructura proteica (Chan i cols., 1994), i en segon lloc, per millorar la unió de la molècula a les columnes d'extracció en fase sòlida, sobretot en columnes de tipus d'intercanvi iònic (Horie i cols., 1998; De Liguoro i cols., 1998).

En el present estudi, el pH en el qual es va extraure el fàrmac a partir del múscul (tampó fosfat pH 8.5) es va incrementar per treballar amb el fetge i el ronyó, i es va utilitzar hidròxid sòdic 7 N i al 50 % respectivament, a causa de les característiques pròpies d'aquests teixits. Alguns autors, prèviament citats, també van haver de tractar aquests teixits (fetge i ronyó) de manera diferencial en el seu mètode d'extracció (Horie i cols., 1998), en alguns casos disminuint el pH de la matriu (Moats i cols., 1985b; Chan i cols., 1994; De Liguoro i cols., 1998), per així millorar la recuperació de la tilosina d'aquest teixit.

En referència als solvents utilitzats, en primer lloc s'ha emprat el cloroform que és àmpliament utilitzat per les seves propietats (Delepine i cols., 1994; Delepine i cols., 1996; Draisci i cols., 2001): dissol els antibiòtics macròlids amb facilitat, és soluble en aigua, cosa que li permet penetrar fàcilment en els teixits, precipita les proteïnes i els lípids, i per últim, dissol poc els carbohidrats i els lípids, cosa que permet obtenir així extractes bastant nets (Petz i cols., 1987). L'altre dissolvent majoritari ha estat el diclorometà amb el qual s'han purificat les mostres un cop extreta la tilosina dels teixits. Altres autors com Takatsuki i cols. (1987); De Liguoro i cols. (1998) i Leal i

cols. (2001) utilitzen metanol o bé acetonitril (Moats i cols., 1985b; Petz i cols., 1987; Lauridsen i cols., 1988; Chan i cols., 1994 i Juhel-Gaugain i cols., 1999).

En el cas de la pell+greix i del greix es va substituir el cloroform i el diclorometà per l'acetat d'etil i pel metanol respectivament per aconseguir una millor recuperació de la molècula.

Malgrat que l'extracció líquid-líquid té molts detractors, principalment per l'ús de dissolvents clorats, un dels seus principals avantatges és que la seva aplicació no és tan cara com l'extracció en fase sòlida, molt utilitzada en els darrers anys.

La quantitat de mostra utilitzada (5 g) no és excessivament gran en el present mètode, cosa que en permet fer una extracció no massa llarga i així obtenir uns perfils cromatogràfics amb una resolució i una especificitat bones. A la vegada, la sensibilitat obtinguda també és bona. Altres autors utilitzen una mida de mostra de l'ordre de 5-10 vegades més gran amb la intenció d'augmentar la sensibilitat del mètode, tant en mètodes d'extracció per pinso, (Ragheb i cols., 1973; Coleman i Mowrey, 1990; Houglum i Tasler, 1996 i Markakis, 1996) com per teixits (Petz i cols., 1987 i Takatsuki i cols., 1987). Això però, comporta una sèrie d'inconvenients com la necessitat d'augmentar el nombre de passos en l'extracció i el volum de dissolvents emprats per a poder aconseguir una resolució i especificitat del mètode bones, encara que en detriment de la precisió i de l'exactitud d'aquest.

Quant a la determinació cromatogràfica, el temps de cromatograma va ser de 10 min, més curt que l'obtingut en altres estudis (Horie i cols., 1998; De Liguoro i cols., 1998; Juhel-Gaugain i cols., 1999; Dubois i cols., 2001) on la tilosina eluïa més tard. Això permet l'anàlisi d'un nombre elevat de mostres en un curt període de temps. L'ús d'una elució isocràtica també ha contribuït a escurçar el temps de cromatograma i a obtenir una major repetibilitat en comparació de l'elució en gradient.

La fase mòbil va ser la mateixa per a tots els teixits analitzats, en canvi, hi ha estudis en què la proporció de fase mòbil ha hagut de ser modificada en funció del tipus de mostra analitzada (Moats i cols., 1985b).

Per finalitzar, el sistema de detecció emprat no presenta grans diferències en sensibilitat en comparació amb altres sistemes més sofisticats com l'espectrometria de masses (Dubois i cols., 2001).

IX.ANNEX 2:
PUBLICACIONES
