



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE LA TILMICOSINA DE LARGA ACCIÓN^{10-20D} EN EL
SECADO PARENTERAL DE VACAS LECHERAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

CORAZÓN DE JESÚS MENDOZA BAUTISTA

TUTOR PRINCIPAL: HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: LILIA GUTIÉRREZ OLVERA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

REYES LÓPEZ ORDAZ, UAM-X

MÉXICO, D.F., ENERO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento durante la permanencia en el programa.

A mis tutores: Dr. Héctor Sumano, Dra. Lilia Gutiérrez y Dr. Reyes López, por su paciencia, tiempo y dedicación durante este periodo.

Al Dr. Ismael Martínez Cortes y Dra. Angélica Ruiz Romero, por la invaluable ayuda, asesoría y tiempo que me dedicaron.

Al Departamento de Clínica y Zootecnia de Rumiantes por las facilidades para realizar parte fundamental de este proyecto.

Al propietario de la unidad de producción “El Puente” y personal que labora en el, por facilitar las instalaciones y animales para la realización de este estudio.

A la Sra. Feliza Carlota González por su apoyo en el laboratorio para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Sr. Palemón Mendoza y Sra. Teresa Bautista quienes me han brindado su cariño, comprensión y apoyo en la vida.

A mi familia quienes han estado siempre conmigo de forma incondicional

A las personas que he conocido durante este periodo y que ahora forman parte de mi vida.

Al Dr. Salvador Avila, por haber confiado en mí y brindarme su apoyo y amistad durante este tiempo.

Para: sumano

Cc: sumano

Asunto: AJVR-15-07-0231.R2

09-Dec-2015

RE: AJVR-15-07-0231.R2, "MAMMARY FLUID CONCENTRATIONS OF TILMICOSIN FROM AN EXPERIMENTAL PREPARATION OF TILMICOSIN AND ITS EFFECTS ON DRY-COW THERAPY"

Dear Dr. Sumano:

I am pleased to inform you that your manuscript is accepted for publication in the American Journal of Veterinary Research, provided that you respond meaningfully to suggestions and questions raised by the editor at the time of editing. The manuscript is now in line for editing. Manuscripts are edited according to the date of this editorial decision. There is nothing further required of you at this time.

Sincerely,

Rosemarie Seymour, D.V.M., Ph.D.
Assistant Editor, Publications Division
American Veterinary Medical Association
1931 N. Meacham Rd., Suite 100
Schaumburg, IL 60173-4360
847-925-8070, ext. 6698
fax: 847-925-9329

RESUMEN

Con base en la vida media prolongada de una nueva preparación farmacéutica de tilmicosina (Til-LA), administrada a dosis de 20 mg/kg, se evaluaron con una dosis (Til-LA₂₀₋₁) o dos dosis con 20 días de diferencia (Til-LA₂₀₋₂), y con ceftiofur vía intramamaria como tratamiento de referencia. Se trataron 56 vacas con Til-LA₂₀₋₂, 58 con Til-LA₂₀₋₁ y 56 con ceftiofur al inicio del periodo seco. La determinación de tilmicosina se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de muestras de fluido mamario obtenidas cada 5 días. El análisis bacteriológico se hizo antes del tratamiento e inmediatamente después del parto, 15 y 30 días después. El conteo de células somáticas se realizó en los mismos tiempos, excepto después del parto. El seguimiento de los residuos de los 2 fármacos se realizó todos los días hasta obtener un resultado negativo. La preparación experimental de tilmicosina mostró una excelente difusión en fluido mamario con un promedio de vida media de eliminación de 4.7 ± 2.3 a 4.9 ± 1.4 d para la primer dosis de Til-LA₂₀₋₁ y Til-LA₂₀₋₂ respectivamente y 7.7 ± 1.6 d para la segunda dosis. La concentración máxima en fluido mamario fue de 20.9 ± 4.9 µg/mL o 17.1 ± 3.1 µg/mL para la primer dosis y 14.4 ± 2.1 µg/mL después de la segunda. El tiempo en alcanzar la C_{MAX} fue de 4.1 ± 0.07 y 3.9 ± 0.4 d para la primer dosis (Til-LA₂₀₋₁ y Til-LA₂₀₋₂, respectivamente) y 3.0 ± 0.5 para la segunda dosis y estos valores también fueron estadísticamente diferentes (P<0.05). La concentración del área contra la curva de tiempo para la unión de áreas bajo la curva de las dos inyecciones de tilmicosina fue de 358.1 ± 51.4 µg/mL·d y el área bajo la curva para la dosis única fue de 177.3 ± 31.6 µg/mL·d (P < 0.01). Se obtuvo una eficacia y cura bacteriológica de 100% para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium spp.* y

Escherichia coli y 75% para *Streptococcus uberis*. Sin embargo, la detección de residuos de antibacterianos muestran que con Til-LA₂₀₋₂ resultaron periodos largos de muestras positivas a tilmicosina después del parto (18 días). El recuento de células somáticas no se modificó ($P < 0.05$). De acuerdo a lo anterior, el uso de una sola dosis de 20 mg/kg de esta nueva preparación de tilmicosina se propone como terapia parenteral en vacas al secado, en particular para tratar infecciones intramamarias de *Staphylococcus* spp.. Sin embargo, se requiere un análisis más detallado sobre la persistencia de residuos del fármaco en cuanto a concentración y tiempo después del parto.

ABSTRACT

Based on the prolonged half-life of a new pharmaceutical preparation tilmicosin (Til-LA), administered at a dose of 20 mg/kg, one dose was evaluated (Til-LA₂₀₋₁), as well as two doses separated by 20 days (Til-LA₂₀₋₂). Ceftiofur via intramammary infusion was used as the treatment of reference. At the beginning of the dry period, 56 cows were treated with Til-LA₂₀₋₂, 58 with Til-LA₂₀₋₁, and 56 with ceftiofur. Determination of tilmicosin concentration was done by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) of mammary fluid samples obtained every 5 days. Bacteriological analysis was done prior to treatment and immediately postpartum, 15 days postpartum, and 30 days postpartum. Concurrent somatic cell count was taken, except immediately postpartum. Pharmaceutical residues of two drugs were measured every day until a negative result was achieved. Experimental preparation of tilmicosin showed an excellent diffusion in mammary fluid with an average half life of elimination of 4.7 ± 2.3 to 4.9 ± 1.4 d for the first dose of Til-LA₂₀₋₁ and Til-LA₂₀₋₂, respectively, and 7.7 ± 1.6 d for the second dose. The maximum concentration in mammary fluid was 20.9 ± 4.9 µg/mL or 17.1 ± 3.1 µg/mL for the first dose, and 14.4 ± 2.1 µg/mL after the second. The time to reach C_{MAX} was 4.1 ± 0.07 and 3.9 ± 0.4 d for the first dose (Til-LA₂₀₋₁ and Til-LA₂₀₋₂, respectively), and 3.0 ± 0.5 for the second dose, and these values were statistically different (P<0.05). The union of the area under the curve versus time of each of the two tilmicosin injections was 358.1 ± 51.4 µg/mL·d, and the area under the curve for the single dose was 177.3 ± 31.6 µg/mL·d (P < 0.01). An efficacy and bacteriological cure of 100% was obtained for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium spp.* and *Escherichia coli*, and 75% for *Streptococcus uberis*. However, detection of antibacterial residues

showed that Til-LA₂₀₋₂ resulted in long periods of tilmicosin positive samples postpartum (18 days). The somatic cell count did not change ($P < 0.05$). Accordingly, the use of a single dose of 20 mg/kg of this new preparation of tilmicosin is proposed for parenteral therapy in dry cows, in particular to treat intramammary infections of *Staphylococcus* spp.. Nevertheless, a more detailed analysis of the persistence of pharmaceutical residues postpartum in terms of concentration and time is necessary.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Revisión de literatura.....	1
1.1.1. Incidencia y epidemiología de la mastitis bovina.....	1
1.1.2. Importancia económica de la mastitis.....	3
1.1.3. Clasificación de las mastitis.....	6
1.1.4. Tratamientos de la mastitis.....	7
1.1.5. Periodo de vaca seca.....	11
1.1.6. Uso de la tilmicosina en el secado	14
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	18
1.3. HIPÓTESIS.....	19
1.4. OBJETIVOS.....	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
2.1. Población animal.....	21
2.2. Microbiología y conteo de células somáticas.....	23
2.3. Tratamiento de secado de vaca.....	24
2.4. Determinación de concentración de tilmicosina.....	25
2.5. Análisis estadístico.....	28
III. RESULTADOS.....	29
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	36
V. REFERENCIAS.....	42

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.1.1.	Sitios de colonización de las principales bacterias causantes de mastitis.....	2
Cuadro 1.1.2.	Principales cambios en producción y composición de la leche causados por mastitis.....	5
Cuadro 2.1.	Edad, producción y número de lactancias de vacas Holstein-Friesian incluidas en este estudio.....	22
Cuadro 3.1.	Parámetros farmacocinéticos de tilmicosina en fluido mamario obtenido de vacas Holstein-Friesian en el periodo seco después de la inyección SC de una o dos dosis de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg.....	32
Cuadro 3.2	Número de casos de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , estafilococos coagulasa negativos, <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> y <i>Escherichia coli</i> , aislados al secado, al parto, 15 y 30 después.....	33
Cuadro 3.3.	Conteo de células somáticas por mililitro de muestras de leche obtenidas de vacas Holstein-Friesian al secado y 15 y 30 días después del parto en vacas tratadas con una o dos dosis de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg SC, en comparación con el grupo tratado con ceftiofur	35
Cuadro 3.4.	Proporciones obtenidas de la prueba de California para mastitis de muestras de leche obtenidas al secado y 15 y 30 días después del parto en vacas Holstein-Friesian tratadas con una o dos dosis de tilmicosina a 20 mg/kg SC y ceftiofur 500 mg/glándula.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura.1.1.4. Disposición de un fármaco después de su aplicación sistémica.....	9
Figura 1.1.6. Inducción de apoptosis en neutrófilos y disminución de daño tisular por inhibición de necrosis.....	16
Figura 3.1. Promedio \pm DE de concentraciones de tilmicosina en muestras de fluido mamario, obtenidas de vacas Holstein-Friesian durante el periodo seco después de la administración una dosis (Til-LA ₂₀₋₁), o dos dosis (Til-LA ₂₀₋₂) de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg por inyección SC.....	31

ABREVIATURAS Y SIGLAS

SCN= Estafilococos coagulasa negativo

CCS= Conteo de células somáticas

IIM= Infección intramamaria

pKa= Constante de ionización

MEC= Matriz extracelular

CMI= Concentración mínima inhibitoria

CMT= Prueba de California para mastitis

SC= Aplicación subcutánea

UFC= Unidades formadoras de colonia

HPLC= Cromatografía líquida de alta resolución

$T_{1/2\beta}$ = Vida media de eliminación

C_{MAX} = Concentración máxima en fluido mamario

T_{MAX} = Tiempo en alcanzar C_{MAX}

AUC= Área bajo la curva de concentración contra tiempo

AUCt= Área trapezoidal bajo la curva de concentración contra tiempo

MRT= Tiempo medio de residencia.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Revisión de literatura

1.1.1. Incidencia y epidemiología de la mastitis bovina

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria inducida por la presencia de microorganismos y sus toxinas que lesionan dicho tejido (Thompson-Crispi *et al.*, 2014; Olivares-Pérez *et al.*, 2015), representa el problema de salud más prevalente en las vacas lecheras y uno de los principales motivos de eliminación permanente de vacas del establo (Oliveira *et al.*, 2013), reduce tanto la cantidad como la calidad de la leche, entre las enfermedades de las vacas lecheras es la única que puede causar la reducción del valor de la leche en Estados Unidos de Norteamérica, (Ruegg, 2012). Es de origen multifactorial y en ella contribuyen factores relacionados a características individuales de la vaca, tales como raza, edad, producción, manejo, etapa de lactancia y condiciones ambientales (Pinedo *et al.*, 2012; du Preez, 2000). La causa puede ser infecciosa o no infecciosa, en la mastitis infecciosa existe una amplia variedad de patógenos causantes, se han identificado más de 137 diferentes organismos como causantes de mastitis, incluyendo bacterias, virus, micoplasmas, levaduras y algas, que varían de acuerdo a la localización geográfica del establo, la época del año, la edad de las vacas y el manejo de las vacas dentro del establo (Bradley, 2002; Crispie *et al.*, 2004).

Los patógenos capaces de causar una infección en la glándula mamaria se clasifican de acuerdo a su mecanismo de infección, en contagiosos y ambientales. Se consideran microorganismos contagiosos a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, estos son capaces de sobrevivir dentro de la glándula mamaria y establecer una infección de tipo subclínica que se diseminan rápidamente de una glándula infectada a otra en la misma vaca o hacia otras

(Bradley, 2002; Oliveira *et al.*, 2013; Thompson-Crispi *et al.*, 2014). Los patógenos ambientales Gram positivos más comunes causantes de mastitis son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y estafilococos coagulasa negativo (SCN), y los Gram negativos *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* (Ruegg, 2012).

Un “patógeno ambiental” se refiere a las bacterias oportunistas que residen en el medio ambiente de la vaca con capacidad de colonizar la glándula mamaria (Ruegg, 2012), los SCN son considerados importantes patógenos ambientales, se encuentran como parte de la flora normal de la piel del pezón y con frecuencia colonizan el canal del pezón, invaden la glándula mamaria, generan una respuesta inmune del huésped y son rápidamente eliminados, sin embargo, con frecuencia causan infecciones crónicas que resultan en un incremento del conteo de células somáticas (CCS) y disminución de la producción de leche (Oliveira *et al.*, 2013). El control de mastitis causada por patógenos ambientales puede ser más complejo que el control de mastitis causada por patógenos contagiosos dada la sobrevivencia y forma de contagio de estos (Ruegg, 2012). Pyörälä (2009) clasifica a los principales microorganismos causantes de mastitis de acuerdo a su localización en la glándula mamaria y vaca, la cual se muestra en el Cuadro 1.1.1.

Cuadro 1. 1. 1. Sitios de colonización de las principales bacterias causantes de mastitis

Microorganismo	Leche/ductos	Tejido mamario	Vaca
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	---	---
Otros estreptococos	+++	+	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	---
Estafilococos coagulasa negativo	+++	---	---
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	---	++	+++
Coliformes	+	--	+++

Adaptado de Pyörälä (2009)

Un importante aspecto del control de la infección intramamaria (IIM) consiste en la prevención del contagio entre animales dentro del establo, considerando que el contagio de patógenos ocurren principalmente durante el ordeño y la susceptibilidad de la glándula mamaria en producción a la infección, la desinfección de la máquina de ordeño entre ordeños está ampliamente recomendada para eliminar el reservorio que representa de principales patógenos para generar una IIM y desarrollo de una mastitis clínica (Barkema *et al.*, 2009). En algunos países, la adopción generalizada de un plan de 5 puntos, ha resultado en una significativa disminución de la prevalencia de mastitis causada por patógenos contagiosos, estos incluyen: 1. Desinfección del pezón antes del ordeño, 2. Administración generalizada de terapia de secado, 3. Tratamiento adecuado de los casos clínicos, 4. Sacrificio de vacas infectadas de forma crónica y 5. Mantenimiento regular de la máquina de ordeño (Ruegg, 2012). Este plan de control ha resultado en una disminución la incidencia global de mastitis, principalmente los causados por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Sin embargo, las infecciones causadas por *Streptococcus uberis* ha venido en aumento (Bradley, Green, 2001).

1.1.2. Importancia económica de la mastitis

La mastitis continúa siendo la enfermedad más importante del ganado lechero, representa el 38% de los costos directos totales de las enfermedades comunes en producción, que surgen del tratamiento, desecho de leche de vacas tratadas, disminución o ausencia de la función de las glándulas con mastitis, disminución de la producción y calidad de la leche, sacrificio y muerte, se considera que alrededor del 70% está asociado con la disminución en producción y calidad de leche. (Bradley, 2002; Zhao, Lacasse, 2008). Aunado a esto las vacas se vuelven más susceptible a otras patologías lo que incrementa el riesgo de sacrificio y los gastos por insumos para el tratamiento y la prevención (Hogeveen, Pyörälä, 2011).

Después de la mastitis clínica, las vacas no regresan a la misma cantidad en producción y si bien pueden mantenerse durante la lactancia, lo hacen con una producción significativamente menor (Rajala-Schultz *et al.*, 1999). Se estima que por lo menos durante el mes próximo después de la mastitis, la producción se ve afectada en un 40% en el caso de primíparas y un 50% en multíparas, con variaciones dependiendo del grado de afección, duración, etiología, y cuidados brindados (Bar *et al.*, 2008).

La mastitis afecta de forma directa la calidad higiénica e indirecta la calidad fisicoquímica de la leche, cambiando su composición a medida en que se genera la respuesta inflamatoria, el grado de estos cambios depende de la patogenicidad del agente causal, de la cantidad de tejido dañado y de la localización del daño en la glándula mamaria (Pyörälä, 2003; Halasa *et al.*, 2007), e incluyen principalmente el flujo de iones, proteínas y enzimas de la sangre hacia la leche debido al aumento de la permeabilidad, invasión de células fagocíticas hacia la luz del alveolo y ductos, disminución de capacidad de síntesis de leche en la glándula, lo que resulta en una disminución de la concentración de ciertos componentes de la leche, los cuales se detallan en el Cuadro 1.1.2.1. (Pyörälä, 2003); todos estos cambios tienen efectos negativos tanto en la calidad de la leche, como en los productos lácteos derivados (Olivares-Pérez *et al.*, 2015).

La mastitis ha sido identificada como la causa más común de muerte de vacas lecheras adultas en lactancia con un 0.6% (Bradley, 2002, Crispie *et al.*, 2004), resultado de una mastitis severa o agalactia que conduce al sacrificio prematuro (Gruet *et al.*, 2001). Por otro lado la eliminación o sacrificio de una vaca con una infección crónica o con un patógeno contagioso, puede ser una importante medida de prevención de transmisión del patógeno a otras vacas no infectadas, lo que representan costos en el control y medidas de prevención en el hato (Musal, Izgür, 2006; Huijps *et al.*, 2008; Hogeveen, Pyörälä, 2011).

La disminución de calidad de la leche se ve afectada por la presentación de mastitis y se evalúa en base al conteo de células somáticas, el cual es un indicador de la salud de la glándula mamaria (Sandgren *et al.*, 2008), por otro lado conforme aumenta el número de células somáticas, la cantidad de leche producida disminuye, de tal manera que existe una relación lineal inversa entre el CCS mayor a 200 000 CS/mL y la producción, disminuyendo un 2.5 % por cada 100 000 CS/mL de aumento (Bradley, 2002).

Cuadro 1.1.2. Principales cambios en la producción y en la composición de la leche causados por mastitis

Disminución	Grado de cambio	Aumento	Grado de cambio
Producción de leche	-(--)	Conteo de células somáticas	+++
Materia seca	-	Proteínas del suero	+++
Lactosa	-	Albumina de suero bovino	+
Grasa	-	Inmunoglobulinas	+++
Ácidos grasos de cadena larga	-	Ácidos grasos de cadena corta	+
Caseína total	--	Ácidos grasos libres	++
Caseína α 1	--	κ caseína	+(+)
Caseína β	---	Sodio	++
α lactoalbúmina	-	Cloruros	++
β lactoalbúmina	---	Lactato	+++
Calcio	---	Lisozima	+++
Magnesio	---	β glucuronidasa	+++
Fosforo	---	Plasmina	+++
Zinc	-		
Potasio	-		

Adaptado de Pyörälä, 2003.

*--- = disminución en mayor grado;

†+++ = aumento en mayor grado

1.1.3. Clasificación de las mastitis

La mastitis se clasifica de acuerdo a su forma de presentación en clínica o subclínica. La forma subclínica se caracteriza por la presencia de un patógeno sin los signos de inflamación local, sin cambios visibles aparentes en la leche o en la ubre, pueden tratarse de casos transitorios con secreción de leche normal y que pueden convertirse en crónicas; es la forma de mastitis más difícil de diagnosticar generando infecciones que persisten por más tiempo dentro del hato, representan un riesgo de transmisión a glándulas sanas y pérdidas en producción de las vacas infectadas. Los signos más evidentes pueden estar referidos con el aumento en el conteo de células somáticas en la glándula afectada, y la presencia del patógeno en la leche obtenidas de esta (Abransen *et al.*, 2014; Thompson-Crispi *et al.*, 2014; Royster, Wagner, 2015).

La mastitis clínica, es una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria que produce cambios en la leche, los cuales pueden ser leche espesa, acuosa, con sangre, pus, coágulos, entre otros (Royster, Wagner, 2015), ocurren con frecuencia alrededor del parto, lo cual coincide con el tiempo de mayor estrés de la vaca y los cambios en la ubre por el marcado aumento de la producción de leche en las glándulas, y contribuye directa o indirectamente el desempeño y salud de la vaca a lo largo de la lactancia (Ballou, 2012). Cualquier IIM puede conducir a la presentación clínica, con presentación leve o moderada, con cambios en la glándula que incluyen inflamación, calor y enrojecimiento. En la presentación severa la respuesta de la glándula incluyen los signos anteriores además de afectación sistémica como fiebre, anorexia y choque. Estas formas de presentación dependen del patógeno presente en la glándula y de la capacidad de respuesta del hospedador (Kasravi *et al.*, 2011; Thompson-Crispi *et al.*, 2014).

1.1.4. Tratamientos de la mastitis

Debido a la importancia que ejerce la mastitis y las IIMs en los bovinos productores de leche y al ser la causa más común las infecciones bacterianas, la terapia antimicrobiana se convierte en una herramienta importante para su control. Diferentes fármacos han sido evaluados para tales fines, entre los que se incluyen, antimicrobianos, antiinflamatorios, electrolitos, vitaminas, vacunas, citocinas, entre otros; así como sus diferentes vías de administración (Gruet *et al.*, 2001; Abransen *et al.*, 2014). El porcentaje de cura de estos tratamientos varía dependiendo del agente infeccioso, de la duración de la infección, y de características propias de la vaca (Sandgren *et al.*, 2008).

Los tratamientos de mastitis clínica y subclínica ayudan a disminuir el riesgo de transmisión de la infección y deben ser elegidos de acuerdo al tipo de presentación y al agente causal. Kasravi *et al.*, (2011), mencionan estudios que demuestran que el tratamiento de IIMs por variedades de estreptococos ambientales, pueden prevenir la presentación de mastitis clínica y la transmisión del patógeno.

La terapia de mastitis clínica es usada durante la lactancia y las IIMs subclínicas generalmente son tratadas con la terapia de secado, debido a que no es viable en el aspecto económico, por ser en muchos de los casos infecciones crónicas que son más difíciles de eliminar, y por los prolongados tiempos de retiro de la leche de vacas tratadas (Sandgren *et al.*, 2008).

La vía de administración de un fármaco y su distribución hacia el sitio de infección es un factor muy importante en el éxito del tratamiento; de manera general, los tratamientos para mastitis e IIMs son con el uso de fármacos antibióticos de aplicación intramamaria, por lo que existen en el mercado un considerable número de preparados en presentaciones para esta vía. Sin embargo, de acuerdo con Bradley, Green (2004) el uso de terapia antimicrobiana intramamaria junto con una terapia sistémica aumenta el porcentaje de cura en glándulas infectadas, por lo

que debe ser considerada esta última vía para la aplicación de tratamientos (Figura 1.1.4.).

Gehring, Smith (2006), considera que la terapia antimicrobiana intramamaria es exitosa en los casos de mastitis causadas por bacterias no invasivas tales como *Streptococcus agalactiae* o Especies de estafilococos coagulasa negativo. Sin embargo, es poco efectiva en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y algunos coliformes que son capaces de invadir más profundo la glándula y formar abscesos y de esta forma evadir la respuesta inmune y limitar el efecto de los fármacos antimicrobianos. Por otro lado, se asume que los efectos terapéuticos de los antibióticos intramamarios se limitan a la leche y los tubos colectores de la glándula mamaria. La importancia de cada vía, depende de la localización del patógeno en la ubre y de las características fisicoquímicas del fármaco de elección (Sérieys *et al.*, 2005).

El fármaco que se considera ideal para el tratamiento de mastitis debe ser una base débil, tener poco porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, ser altamente liposoluble, tener un espectro apropiado y no dañar la glándula mamaria (Gruet *et al.*, 2001; Sumano *et al.*, 2015).

La causa más común de fallas en el tratamiento de mastitis, es la falta de contacto del antibiótico con la bacteria; dado que para que un fármaco sea efectivo, debe alcanzar concentraciones terapéuticas en el sitio de infección y mantenerse ahí por un tiempo adecuado con la capacidad de matar a las bacterias que se encuentran libres en la leche, unidas a superficies de las membranas (algunas especies de estreptococos), e incluso las que viven en los compartimentos intracelulares como es el caso de *Staphylococcus aureus* en neutrófilos polimorfonucleares (Figura 1.1.4.) (Gruet *et al.*, 2001; Serieys *et al.*, 2005).

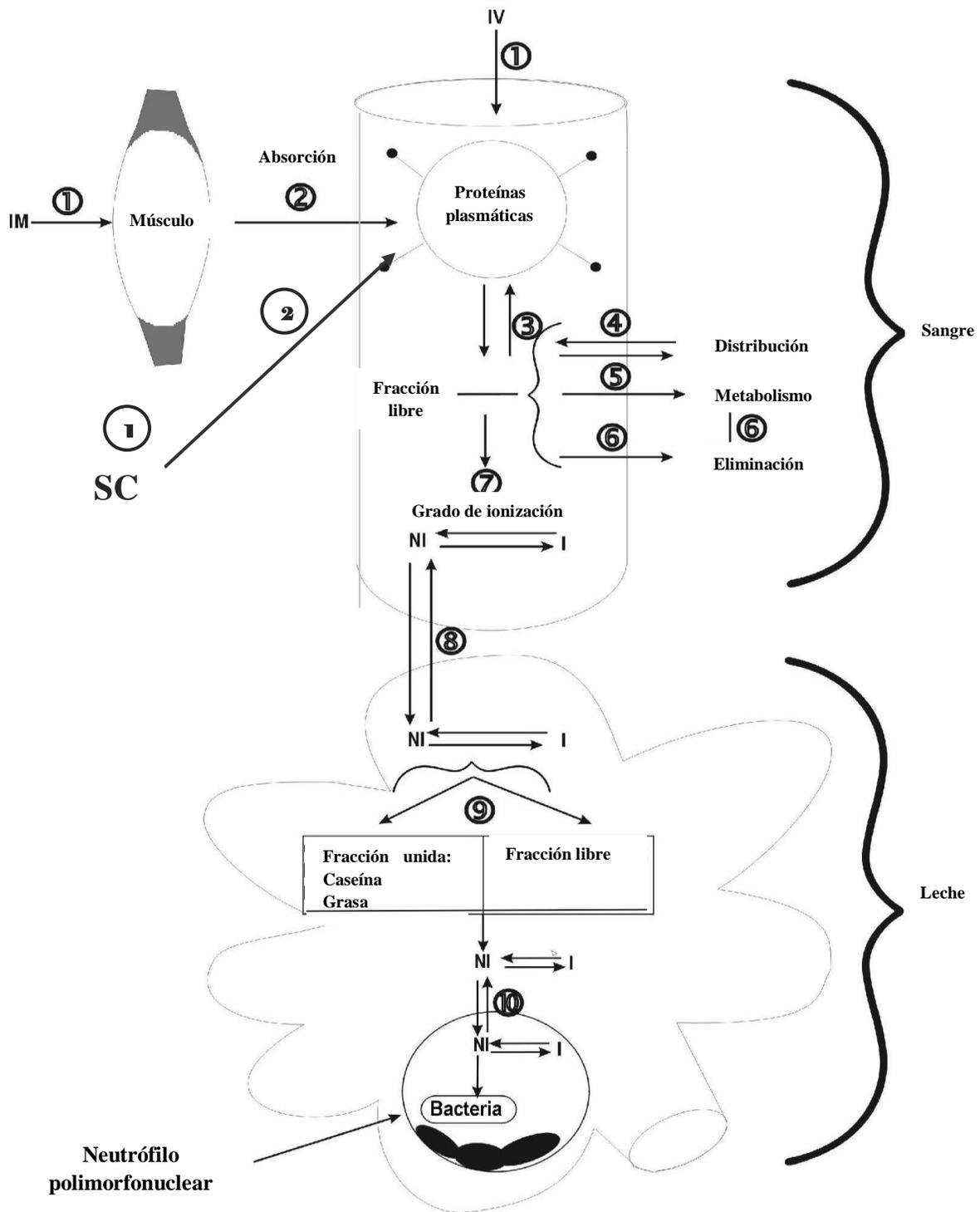


Figura.1.1.4. Disposición de un fármaco después de su aplicación sistémica. Adaptado de Gruet *et al.*, 2001.

La biodisponibilidad de un fármaco es parte fundamental para la eficacia del tratamiento, que puede verse afectado por el grado de ionización del fármaco, que depende de su constante de ionización (pK_a) y del pH del medio circulante. El pH del plasma (7.4) es relativamente constante, mientras que el pH de la leche puede variar entre 6.4-6.6 en la leche normal y hasta 7.4 en casos de mastitis, por lo que el grado de ionización de un fármaco en la leche, depende de la severidad de la infección, y de los cambios propios de una mastitis incluyendo el pH (Gruet *et al.*, 2001). Otro factor que afecta directamente la distribución de un fármaco, es la unión a proteínas en plasma, leche y tejidos, lo que resulta en una interacción no específica del fármaco y proteína, con la formación del complejo fármaco-proteína demasiado grandes como para atravesar tejidos y membranas, por tanto disminuye la cantidad del fármaco que puede difundirse libremente hacia tejido (Gehring, Smith, 2006). La liposolubilidad es otro factor importante a considerar en la elección de un fármaco para el tratamiento de las mastitis, es una importante propiedad que determina la facilidad con el que el fármaco se moverá a través de las membranas ricas en lípidos que forman parte de la estructura de la glándula mamaria, lo que le confiere la capacidad de difundirse más profundamente en la ubre (Gruet *et al.* 2001).

La mastitis produce cambios físicos y químicos en la glándula mamaria que pueden alterar el proceso de distribución del fármaco, en el proceso de inflamación, el sistema de ductos puede ser comprimido lo que resulta en una limitada o desigual distribución del fármaco. Así también, esta inflamación produce cambios en la permeabilidad que puede mejorar la absorción sistémica y quizá la distribución del fármaco en la ubre (Gehring, Smith 2006).

1.1.5. Periodo de vaca seca

El periodo seco es el lapso de tiempo entre el último ordeño y el parto de la vaca, coincide con la última etapa de la gestación y crecimiento del feto, es el momento más crítico donde la vaca se prepara metabólicamente para la próxima lactancia. Durante este periodo, en la glándula se producen cambios bioquímicos, celulares e inmunológicos que la preparan para la siguiente lactancia. Pezeshki *et al.*, (2010), mencionan que en vacas lecheras, el periodo seco es necesario para reemplazar las células epiteliales mamarias senescentes y con ello maximizar la producción de leche en la siguiente lactancia. Al mismo tiempo proponen cuatro puntos de impacto del periodo seco en la producción de leche en estas vacas y son:

1. Nutrición, punto clave dado que el periodo seco es requerido por las vacas para tener suficientes reservas antes del parto y para mantener una producción óptima de leche en la siguiente lactancia.
2. Hormonal. Punto basado en la reducción en la producción de leche para facilitar el primer punto y para reactivar los ejes hormonales, principalmente el parto y posteriormente el ciclo estral (Grummer, 2007).
3. Reducción de la matriz extracelular. Se ha sugerido a la reducción en el volumen de la matriz extracelular (MEC) como una causa en la disminución de leche durante el periodo seco largo.
4. Duración del periodo seco. Un periodo seco adecuadamente largo es necesario para promover la renovación celular y la sustitución de MEC y células senescentes durante el final de la gestación. Un tiempo prolongado mejora la producción pero aumenta la tasa de mastitis y viceversa, un tiempo corto no genera una producción óptima, pero reduce la tasa de mastitis. El punto de equilibrio depende de factores de manejo, raza, nutrición, higiene del hato, entre otros. Desde el punto fisiológico el periodo ideal debe comprender entre 40 y 70 días.

Existen tres principales fases en el periodo seco: involución, en esta, la glándula mamaria es más susceptible a la infección como resultado del cese del ordeño y de la lenta transición a un estado involutivo, los microorganismos existentes en la piel del pezón tienen la oportunidad de colonizar el seno del pezón y de ahí ascender hacia el resto de la glándula. En la fase completamente involutiva, la glándula mamaria es considerada resistente a una nueva infección, en este momento se secretan inmunoglobulinas, lactoperoxidasa y lactoferrina, entre otros, que proveen de protección a la glándula. Durante la transición a calostrogénesis, la glándula mamaria otra vez se vuelve susceptible a IIMs; la función de los leucocitos disminuyen y los niveles de antibióticos están por debajo de la concentración mínima terapéutica, en esta fase la glándula empieza a producir calostro en grandes cantidades, ejerciendo presión intramamaria que en muchos casos desprende el tapón de queratina del ápice del pezón y queda expuesta a la colonización de patógenos (Bradley, Green, 2004).

El periodo seco representa para la glándula mamaria un momento crítico para adquirir una nueva infección, y esta puede estar influenciada por la exposición al patógeno, instalaciones de la unidad de producción, susceptibilidad individual de la vaca, edad, época del año y de la eficacia de protección de la terapia de secado (Musal, Izgür, 2006; Green *et al.*, 2007). Tiene un impacto en la incidencia y distribución de mastitis clínica en la siguiente lactancia, generalmente estas infecciones no se ven como casos clínicos durante el periodo seco, sino después, durante la lactancia siguiente. Crispie *et al.*, (2004), mencionan que durante el periodo seco ocurre infecciones hasta 10 veces más que durante la lactancia, por otro lado Bradley (2002), refiere que hasta un 60% de las mastitis clínicas durante los primeros 100 días de lactancia tienen origen durante el periodo seco, de esto se estima que hasta en un 50% son responsables de mastitis clínica por enterobacterias y 50% de por *Streptococcus uberis* que se dan durante la lactancia. La buena selección de una terapia de secado ha demostrado ser un

excelente método para el mantenimiento de una ubre sana y se ha sugerido como método de elección para el manejo de la vaca seca (Pyörälä, 2002).

La terapia de secado es considerada uno de los componentes más importantes del programa de control de mastitis, ya que provee el momento ideal para una terapia intramamaria con el objetivo de eliminar las infecciones que han permanecido durante la lactancia, así como la prevenir y/o disminuir la incidencia de nuevas IIM durante los 45-60 días que dura. En este periodo se puede lograr un sinergismo entre la terapia antimicrobiana y la función del sistema inmune para eliminar patógenos de la glándula mamaria sin incurrir en gastos excesivos comunes en la lactancia (Erskine *et al*, 2003; Pinedo *et al.*, 2012).

La terapia de secado es efectiva en un 70-85% de cura de IIMs existentes en el momento de secado y está íntimamente relacionado con el patógeno en cuestión. El porcentaje de cura es menor y con amplias variaciones especialmente en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* (27-80%), el cual mediante sus mecanismos de patogenicidad puede sobrevivir a la fagocitosis y mantenerse dentro de las células epiteliales y neutrófilos. Otro objetivo en la terapia de secado es la prevención de nuevas IIMs, en el cual existen reportes en un 50-70% de éxito (Broulletea *et al.*, 2003; Musal, Izgür, 2006; Halasa *et al.*, 2009a). Barkema *et al.*, (2009), fortalece lo anterior haciendo mención que el riesgo de una nueva infección intramamaria en glándulas o vacas que no recibieron una terapia de secado con antibióticos es de 1.5 a 1.9 veces mayor a las que si la recibieron.

Gruet *et al.*, (2001) y Royster, Wagner (2015), mencionan algunas ventajas de la terapia de sacado contra IIMs en comparación a una terapia durante la lactancia, como que en el periodo seco se pueden aplicar grandes cantidades del fármaco, los cuales permanecerán con concentraciones terapéuticas por encima de la concentración mínima terapéutica por un periodo prolongado en ausencia de ordeño, si bien casi todos los antimicrobianos no permanecen durante todo el periodo seco, si alcanzan cubrir por lo menos la mitad; el riesgo de presencia de

residuos se reduce si se hacen los manejos adecuados. Se han probado diferentes preparados y combinaciones de fármacos para este fin, entre los principales podemos mencionar al cefalonium, ceftiofur, cloxacilina, penicilina, neomicina, cefapirina benzatinica, entre otros; de igual forma se han hecho combinaciones de tratamientos intramamarios y sistémicos y solo tratamientos sistémicos con el fin de aumentar el éxito terapéutico, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, y de los cuales se pueden mencionar a las tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim, fluoroquinolonas, macrólidos y lincosamidas (Robert *et al.*, 2006; Musal, Izgür, 2006).

1.1.6. Uso de la tilmicosina en el secado

La tilmicosina es un anillo de 16 átomos, su estructura química es tilosin, 4^A-0-deoxo-20-(3,5-dimetilo-1-piperidinil) [20(cis)], fosfato. Tiene un pK de 7.4-8.6 y un peso molecular de 967.15, es un antibiótico macrólido semisintético resultado de las modificaciones químicas hechas en la desmicosina (Buret 2010; Sumano *et al.*, 2015), tiene actividad contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, fue desarrollado y aprobado para su uso en medicina veterinaria para combatir enfermedades respiratorias en bovinos y cerdos causadas por *Pasterella multocida*, *Pasterella haemolitica*, *Actinobacillus pleuroneumoniae* y especies de mycoplasma a una dosis de 10 mg/kg por vía subcutánea (Ziv *et al.*, 1995; Scoreaux, Shryock 1999; Avci, Elmas, 2014).

Los antibióticos macrólidos pueden ejercer una acción terapéutica independiente de su actividad antimicrobiana, afectan procesos involucrados con la inflamación, tales como la migración de neutrófilos y la fagocitosis, tienen la capacidad de disminuir la producción de mediadores pro-inflamatorios y citocinas incluyendo TNF- α e IL-1 β , además de la habilidad para penetrar y acumularse en leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos, lo que le confiere la capacidad de modular las funciones de este tipo de células, y partiendo de que los macrófagos y

granulocitos están presentes en grandes cantidades en el sitio de una infección bacteriana, el antibiótico tiene más posibilidades de llegar al sitio de infección específica y en altas concentraciones para ejercer su efecto. De acuerdo a sus características farmacocinéticas, las concentraciones en tejidos son de 5 a 10 veces mayor que las concentraciones en plasma. (Anodón, 1999; Čulić *et al.*, 2001; Zalewska-Kaszubsk, Górska, 2001).

Los macrólidos han demostrado ser inductores de la apoptosis, específicamente tilmicosina, que indujo apoptosis en neutrófilos pulmonares independientemente de la presencia o ausencia *Pasterella haemolytica* en becerros infectados experimentalmente, este efecto está asociado a la reducción de leucotrieno B4 proinflamatorio (Chin *et al.* 2000). La Figura 1.6.1. muestra los beneficios clínicos que puede generar el uso de tilmicosina, mediante la inducción de apoptosis y disminución del daño tisular severo que genera la necrosis, esta inducción de la apoptosis de neutrófilos confiere propiedades antiinflamatorias a la tilmicosina, sin interferir con la diapédesis celular, la migración y la infiltración pulmonar (Buret, 2010).

Si bien la tilmicosina ha sido utilizada principalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias debido a sus características farmacocinéticas que muestran afinidad por tejido pulmonar, también ha sido probado para el tratamiento de IIMs al secado en diferentes protocolos con la administración intramamaria como terapia de secado específicamente contra IIMs causadas por *Staphylococcus aureus* resultando en curas consideradas altas que van desde el 72.5 a 74.2% (Nickerson *et al.*, 1999; Dingwell *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta que *Staphylococcus aureus* es un patógeno especialmente difícil de eliminar, parte de este porcentaje de éxito puede ser explicado con trabajos realizados por Scorneaux, Shryock (1999) quienes encuentran una extensa penetración de tilmicosina hacia glándula mamaria después de la aplicación subcutánea de 10 mg/kg y su presencia por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) hasta por 7.5 días, considerando una CMI₉₀ de 0.78 µg/mL contra *Staphylococcus*

aureus. Estudios *in vitro* desarrollado por estos autores señalan una marcada acumulación en las células epiteliales, macrófagos y neutrófilos, incluso demostraron la presencia de tilmicosina dentro de lisosomas, el mismo compartimento en el que se localiza *Staphylococcus aureus*.

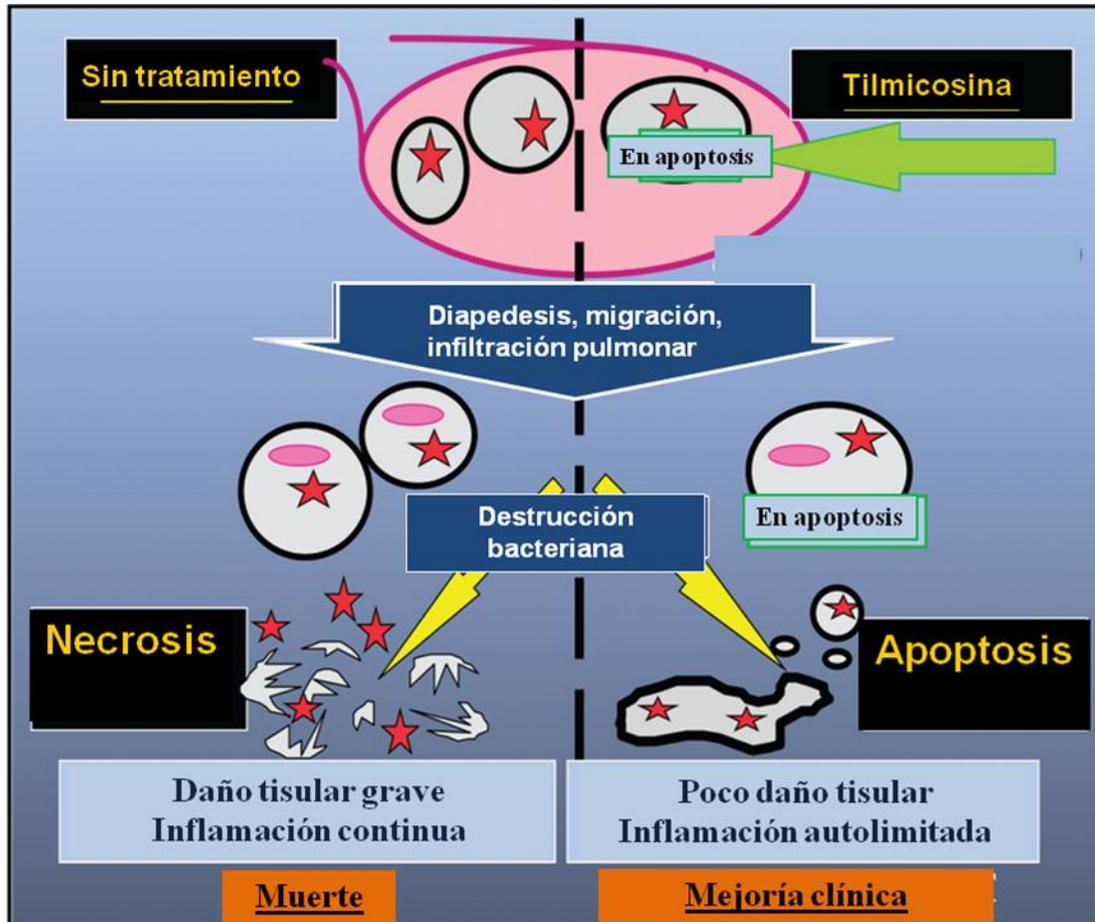


Figura 1.1.6. Inducción de apoptosis en neutrófilos y disminución de daño tisular por inhibición de necrosis. Adaptado de Buret, 2010.

Una nueva preparación experimental de tilmicosina ha sido descrita, esta preparación libera la tilmicosina del poloxamero 407^a (Dumortier *et al.*, 2006) termoreversible con una cinética de orden cero, produciendo una prolongada vida media de eliminación (39.8 h), de ocho a diez días de concentraciones séricas útiles son alcanzadas con una dosis de 20 mg/kg y la constante liberación del gel poloxamero 407 formado *in situ* evita el pico de concentración sérica. Por tanto no se observan cambios en la frecuencia cardiaca ni signos de intoxicación cardiaca (Soriano, 2012).

^a Copolimero con propiedades termorreversibles utilizado en formulaciones para mejorar el perfil de liberación prolongada.

1.2. JUSTIFICACIÓN

La nueva preparación de tilmicosina a base de poloxamero 407, con patente a favor de la UNAM^b (Tilmicosina de larga acción ^{10-20D})^c, tiene una duración de concentraciones séricas terapéuticas hasta por 10 días aproximadamente, por lo tanto, es factible especular, con base en las proporciones que alcanza la tilmicosina referente en otros estudios, (Nickerson *et al.*, 1999) que las concentraciones en leche pueden ser útiles contra muchos microorganismos patógenos, incluyendo *Staphylococcus aureus* por lo menos 20 días. De tal manera que sin manipular los pezones de la vaca se pueden generar concentraciones homogéneas por 20 días en las cuatro glándulas al inyectar una dosis de esta tilmicosina (20 mg/kg) y al repetir esta inyección a los 20 días, se tendrá protección contra las infecciones en el periodo seco virtualmente todos los 45 días de un periodo seco normal. Se postula entonces que se tendrían como beneficios, el tratamiento de las 4 glándulas con una sola inyección cada 20 días (una al inicio del periodo seco y otra 20 días después). Las vacas con infecciones subclínicas y aun clínicas serían tratadas correctamente teniendo como periodo de tratamiento mínimo 40 días, sin manipular los pezones ni lesionar el meato y conducto del pezón, factores que ya se han ponderado como críticos para no generar infecciones ascendentes (Barkema *et al.*, 2009). Dado que se ha descrito que la mayoría de los casos de mastitis clínicas durante la lactancia fueron adquiridos durante el periodo seco, es congruente pensar que una buena terapia de secado se refleje en una menor incidencia de mastitis clínica en los primeros días de lactancia. A su vez, esto se traduce en una mayor producción de leche, dado que los casos de mastitis dependiendo del grado de afección pueden reducir hasta un 50% de la producción del tejido mamario (Hagnestam *et al.*, 2007; Halasa *et al.*, 2009b)

^b Patente en trámite No. 212148; *Instituto Mexicano de la Protección Industrial*, Ciudad de México.

^c 10-20 D = referencia a los datos farmacocinéticos de 10 días de duración en suero y 20 días de duración en tejidos respiratorios y/o mamarios.

1.3. HIPÓTESIS

La administración SC de Tilmicosina de larga acción ^{10-20D} a dosis de 20 mg/kg al inicio del periodo de seco y 20 días después, genera concentraciones terapéuticas del macrólido en leche o fluido mamario, suficientemente elevadas para ser consideradas terapéuticas durante todo el periodo seco.

La administración SC de Tilmicosina de larga acción ^{10-20D} a dosis de 20 mg/kg al inicio del periodo de seco y 20 días después, puede servir como tratamiento de secado parenteral en vacas evaluando microbiológicamente, con conteo de células somáticas y mediante prueba de California, al inicio del secado y una semana después de iniciada la lactancia.

La administración SC de Tilmicosina de larga acción ^{10-20D} a dosis de 20 mg/kg al inicio de periodo seco y 20 días después, reducirá la tasa de mastitis y el número de células somáticas en leche en las primeras semanas de lactancia.

1.4. OBJETIVOS

1. Determinar la concentración de tilmicosina en muestras de leche o fluido mamario de vacas tratadas con la nueva preparación de tilmicosina a dosis de 20 mg/kg SC con aplicación al inicio del periodo seco y 20 días después.
2. Evaluar el estatus bacteriológico, mediante la prueba de California para mastitis y de células somáticas de las glándulas de vacas tratadas con tilmicosina, al iniciar el secado y una semana después del parto y comparar los resultados con el tratamiento a base de ceftiofur intramamario de larga acción como referente.

3. Realizar seguimiento del estado de salud de las glándulas mamarias por cuatro semanas después del parto mediante la prueba de California para mastitis y pruebas bacteriológicas cada dos semanas, tanto en el grupo tratado con tilmicosina como en el grupo tratado con ceftiofur como referente.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Población animal

Este trabajo se realizó en la unidad de producción “El Puente”, ubicado en Ixtlahuaca de Rayón, Ixtlahuaca, Estado de México, el cual se encuentra a una altura de 1300 msnm presenta un clima templado subhúmedo con precipitación anual de 828.4 mm y una temperatura media anual de 14.8 °C (INAFED, 2015). La unidad de producción tiene 1500 vacas Holstein-Friesian en producción, con una producción promedio de 23 L/vaca/día. Este estudio incluyó 360 vacas que entraban a periodo seco; de estas, 170 vacas fueron diagnosticadas con infecciones con alguna de las especies de estafilococos, 24 de estas tenían más de una IIM con *Streptococcus uberis*, *Corinebacterium* spp. y *Escherichia coli*. Estos animales fueron divididos de forma aleatoria en tres grupos, haciendo bloques por el patógeno *Staphylococcus* spp., como se muestra en el Cuadro 2.1. Todos los animales incluidos en este trabajo fueron de 3 a 7 años de edad, con un periodo de lactancia promedio por vaca de 2.5. Las vacas fueron examinadas y consideradas clínicamente sanas, con las cuatro glándulas mamarias funcionales, libres de lesiones en el pezón y sin reportes de haber recibido tratamientos con antibióticos 30 días antes de este estudio. El tiempo de periodo seco en esta unidad de producción fue de 45 días.

Cuadro 2.1. Edad, producción y número de lactancias de vacas Holstein-Frisian incluidas en este estudio.

Grupo	Promedio de edad (Años)	± DE	Promedio de días en leche*	± DE	Promedio de producción (kg)	± DE	Lactancias promedio	± DE	Número de lactancias	%
Ceft-LA (56 vacas)	4.4*	1.17	293.88	15.75	6791.34	1205.66	2.25	1.04	1	17.2
									2	31
									3	27.5
									4	17.2
									5	6.8
Til-LA ₂₀₋₂ (56 vacas)	5.07	1.44	289.85	19.1	6916.09	1006.68	2.75	1.26	1	14.2
									2	35.7
									3	25
									4	10.7
									5	14.2
Til-LA ₂₀₋₁ (58 vacas)	4.86	1.43	285.28	20.46	7284.09	1333.82	2.64	1.17	1	25
									2	39
									3	25
									4	7.1
									5	3.5

*En el actual ciclo de lactancia

2.2. Microbiología y conteo de células somáticas

Para el estudio bacteriológico se colectaron tres muestras de leche de 20 mL mediante técnica aséptica de acuerdo a lo recomendado por National Mastitis Council (NMC, 2004) 5 días antes del inicio del periodo seco. Las muestras fueron colectadas en tubos estériles y fueron refrigeradas a 3°C para ser transportadas al laboratorio para su análisis el mismo día. Antes del proceso, las muestras fueron agitadas con ayuda del agitador vórtex por 5 minutos a una velocidad de 1600 rpm para obtener una muestra homogénea, de la cual se inoculó 30 µL sobre 3 placas de agar sangre y agar McConkey como medios de cultivo, se incubaron bajo condiciones de aerobiosis a 37°C por 48 horas (NMC, 2004). Las colonias fueron inicialmente clasificadas por sus características morfológicas, reacción a catalasa, resultados a tinción de Gram y capacidad hemolítica. Las bacterias Gram negativas fueron sometidas pruebas bioquímicas para su total identificación, de acuerdo a lo recomendado por Carter *et al.*, (1984). Las bacterias Gram positivas se sometieron a prueba de catalasa, las cepas positivas fueron sometidas a prueba de coagulasa en plasma de conejo. Las bacterias Gram positivas, catalasa negativos fueron sometidos a prueba de CAMP (Chistie, Atkias and Munch Peterson) y esculina, las bacterias coagulasa positivas se sometieron a prueba de polimixina b. Si más de tres bacterias diferentes fueron identificadas en un mismo cultivo, la muestra se consideró contaminada y fue excluida del estudio. El día del secado, los pezones fueron desinfectados con clorhexidina, posterior a esto se descartaron aproximadamente 20 mL de leche y se tomaron los siguientes 10 mL para hacer la prueba de California para mastitis (CMT) y determinar el conteo de células somáticas (CCS) mediante el contador electrónico de células somáticas^d. El mismo procedimiento de muestreo para análisis microbiológico, se realizó al

^d Ecomilk Scan[®], Bulteh 2000, Bulgaria

parto, el día 15 y 30 después del parto. CMT y CCS se realizaron los días 15 y 30 después del parto.

Las infecciones intramamarias al secado fueron definidas por el aislamiento del patógeno y el número de unidades formadoras de colonia (UFC) igual o mayor a 3 UFC/30 μ L de inóculo en al menos 2 de las 3 repeticiones procesadas. El criterio de cura para este estudio fue la ausencia del patógeno previamente identificado en tres muestreos consecutivos de leche: al parto, 15 y 30 días después. Una nueva IIM fue definida como la presencia del patógeno en una glándula diferente a la previamente identificada.

2.3. Tratamiento de secado de vaca

En el día de secado, después del ordeño las vacas fueron asignadas al azar para recibir uno de los siguientes tres tratamientos: el primer grupo experimental (56 vacas) fue tratado con una preparación a base de polímeros (Poloxamero 407) de 40% de fosfato de tilmicosina diseñado para una larga acción extendida (Tilmicosina de larga acción ^{10-20D}). La dosis administrada fue de 20 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea en el día del secado y 20 días después (Grupo Til-LA₂₀₋₂). Los sitios de inyección elegidos fueron las porciones laterales de la región del cuello, junto al tórax. De acuerdo al peso de las vacas tratadas, la dosis requerida se inyectó en tres volúmenes iguales, usando jeringas de 10 mL con agujas de calibre 16 de 3 cm de longitud, a una cantidad no mayor a 10 mL por sitio de inyección. El segundo grupo experimental (58 vacas) fue tratado mediante el mismo procedimiento que el anterior, pero usando solo una dosis de 20 mg/kg el día de secado (Grupo Til-LA₂₀₋₁). El tercer grupo (56 vacas) fue tratado con una infusión intramamaria de 500 mg de clorhidrato de ceftiofur como suspensión estéril^e (Grupo Ceft-LA); En este caso, la infusión fue realizada después del último

^e Spectramast® DC, Zoetis, México

ordeño bajo condiciones asépticas de la forma siguiente: primero se lavó toda la ubre (en caso necesario), se volvió a lavar con particular énfasis en la limpieza de cada pezón con agua tibia que contenía un antiséptico a base de clorhexidina^f, Los pezones fueron secados con toallas de papel, posteriormente se usaron torundas de algodón con alcohol al 70% para limpiar el meato del pezón en dos ocasiones, se desecho el resto de leche contenido en los pezones, para después administrar el preparado antimicrobiano en el seno del pezón, seguido de un suave masaje para difundirlo hacia el resto de la glándula.

Después de la aplicación de los tratamientos y hasta el parto, los animales del estudio estuvieron bajo condiciones de manejo comunes de vaca seca de esta unidad de producción, que incluye la separación del resto del hato, cambios de dieta propios de este periodo, observaciones diarias para detectar casos de mastitis y otros padecimientos. Para determinar las concentraciones de tilmicosina en muestras de fluido mamario, de forma muy cuidadosa de acuerdo con NMC (2004), se obtuvieron las muestras de este fluido (5-10 ml) de una glándula de cada vaca en un intervalo de 5 días hasta el parto y una muestra más un día después. Cinco vacas fueron elegidas al azar por cada momento de muestreo y no fueron muestreadas más de una vez. Después de tomar la muestra, cada pezón fue cubierto con un preparado sellador de pezones^g.

2.4. Determinación de concentración de tilmicosina

La determinación de la tilmicosina se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) descrito por Parkel, Patel (1994), todos los solventes usados fueron grado HPLC; se usaron fosfato de tilmicosina y tartrato de tilosina^h,

^f Biofarm®, DeLaval, México

^g Valiant Triple Protección, ABS, México

^h SIGMA = tilmicosin Ref: 33864 and tylosin Ref: 33847

como patrón interno. El sistema HPLCⁱ, está equipado con una bomba cuaternaria, una columna C18 (4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm) y una pre columna C18 (4.6 mm × 20 mm). También está equipado con un detector UV y detector de diodos. El análisis se realizó con un software patentado^j.

La extracción de tilmicosina se basó en su carácter básico. En la extracción inicial líquido-líquido, la tilmicosina se mantuvo en una solución ligeramente ácida, mientras que las impurezas fueron eliminadas en una fase orgánica no polar. Se colocaron 3 mL de muestras de fluido en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se homogeneizaron. A continuación, se añadieron 10-30 mL de metanol (MeOH) y se agitó durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 3000 g y el sobrenadante se separó en vasos de precipitados de 250 mL, el tubo de ensayo se enjuagó con otros 30 mL de etanol. Las muestras se resuspendieron con una varilla de agitación, se agitó por 5 minutos y se centrifugó de nuevo por 10 minutos a 3000 g el sobrenadante resultante se combinó con el del vaso de precipitado y se añadieron 30 mL de cloruro de sodio al 30%. Cuando fue necesario el pH se ajustó gota a gota con ácido clorhídrico (HCl) 1 a 4N. A continuación se añadió 50 mL de hexano para la extracción acuosa y se agitó durante 30 segundos con ventilación de forma regular y se desechó la capa de hexano. La partición se repitió con 25 mL adicionales de hexano, la capa de hexano obtenida se desechó. El pH de la capa acuosa se ajustó a 9.0 con una solución de carbonato de sodio a 0.5 M. Después, se añadió 20 mL de cloroformo:hexano (2:1), la muestra se agitó y dejó separar las fases, La capa de cloroformo:hexano se separó y se volvió a repetir este procedimiento. La fase orgánica fue evaporada hasta sequedad y el residuo se volvió a suspender en 5

ⁱ High Performance Liquid Chromatograph: JASCO X-LC 3159; Quaternary pump = PU-2089 Plus JASCO Serial No. C160960865; UV detector = UV-2075 Plus JASCO Serial No. 0262060866; Diode array detector = JASCO MD-20120 Plus JASCO Serial No. D087860870. Easton, MD, USA; Symmetry C18 column and pre-column = Waters, México

^j EASYCHROM 2.0. Chrom&Spec software, Ampersand International, Inc., Moscow, Russia.

mL de MeOH y 5 mL de fosfato de amonio de dibutilo a 0.05 M. La muestra se sometió a ultrasonidos para asegurar la completa disolución. Los extractos se procesaron mediante la extracción de fase sólida. Finalmente, las muestras se filtraron con acrodiscos de 0.22 µm para ser analizadas.

El procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución se realizó inyectando 50 µL con un índice de flujo de 1.5 mL/min. La separación se realizó usando un análisis de triple gradiente con 50% de acetonitrilo en agua con un pH = 2.5 y fosfato de amonio de dibutilo a 0.08 M. El tiempo de ejecución fue de 30 min con un tiempo de carga de 10 min. La tilmicosina fue detectada en una longitud de onda de 280 nm. El límite de detección fue de 0.015 µg/mL y el límite de cuantificación de 0.045 µg/mL. La prueba de robustez y tolerancia indica una diferencia absoluta de 1.54 (<2.0) y un coeficiente de variación de 1.2% (<2.0%).

Los datos de concentración de fluido mamario, basados en la concentración individual frente a curvas de tiempo, fueron procesados mediante un software especializado^k y se obtuvieron los siguientes parámetros: $T_{1/2\beta}$ = Vida media de eliminación; C_{MAX} = Concentración máxima en fluido mamario, T_{MAX} = Tiempo en alcanzar C_{MAX} ; AUC = Área bajo la curva de concentración frente a tiempo en fluido mamario; MRT = Tiempo medio de residencia en fluido mamario. Fue usado el modelo 13 ($r = 0.925$), con la siguiente fórmula general:

$$\text{Concentración (Tiempo)} = Ae^{-a \cdot \text{Tiempo}} + Be^{-b \cdot \text{Tiempo}} + Ce^{-KAB \cdot \text{Tiempo}}$$

Se realizaron análisis diarios de residuos de tilmicosina mediante una prueba cualitativa comercial de fármacos antimicrobianos^l durante los días necesarios después del parto hasta obtener un resultado negativo. Esto se realizó en todas las vacas de los tres grupos.

^k PKAnalyst. Micromath Scientific Software, SLM, USA

^l Delvotest®, DSM, Heerlen, Netherlands

2.5. Análisis estadístico

Los datos de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de 5 vacas completamente al azar por cada momento de muestreo fueron analizados con SAS (2012), mediante un análisis de varianza de una sola vía. La eficacia fue considerada por cada glándula individual mediante estadística no paramétrica usando la prueba de Kruskal Wallis SAS (2012). Las comparaciones del conteo de células somáticas fueron realizadas mediante un modelo mixto de un paquete estadístico en un diseño completamente aleatorizado con medidas repetidas en el tiempo (Littell *et al.*, 1996), el modelo incluye la combinación de efectos de tratamiento, tiempo e interacción del tratamiento con el tiempo. El modelo usado es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{tratamiento}_i + \text{tiempo}_j + \text{tratamiento} \times \text{tiempo}_{ij} + E_{ijkl}$$

Donde Y_{ijkl} es una observación de la variable respuesta; μ es la media general; tratamiento_i es el efecto fijo del tratamiento i^{th} ($i=1,2$ y 3); tiempo_j es el efecto fijo del periodo de experimentación j^{th} ($1, 2$ y 3); $\text{tratamiento} \times \text{tiempo}_{ij}$ es el efecto de interacción del tratamiento por tiempo y E_{ijkl} es el error aleatorio.

III. RESULTADOS

La lista de bacterias identificadas en este estudio se incluye en el cuadro 3.2., donde se muestra el índice de IIM por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Estafilococos coagulasa* negativos, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp. y *Escherichia coli* en vacas incluidas en este estudio antes y después del tratamiento con una o dos dosis de tilmicosina y con ceftiofur (grupos Til-LA₂₀₋₁, Til-LA₂₀₋₂ y Ceft-LA). La eficacia clínica y la cura bacteriológica fueron del 100% en todos los grupos evaluados en los días 1, 15 y 30, excepto *Streptococcus uberis* con dos aplicaciones de tilmicosina con 20 días de diferencia (Til-LA₂₀₋₂), el cual solo mostro un 75% de cura, sin embargo no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos (P<0.05).

El promedio \pm DE de concentraciones de tilmicosina en fluido mamario durante el periodo seco de 45 días después de la inyección de una o dos dosis (20 días después) del preparado experimental de tilmicosina usada, se muestran en la figura 3.1. y las variables farmacocinéticas obtenidas de estas concentraciones en el cuadro 3.1. El promedio de vida media de eliminación en fluido mamario ($T_{1/2\beta}$) fue de 4.7 a 4.9 ± 1.4 d para la primer dosis, Til-LA₂₀₋₁ y Til-LA₂₀₋₂ respectivamente y 7.7 ± 1.6 d para la segunda dosis. La comparación de estos valores por dosis muestran una diferencia estadística significativa (P<0.05). La concentración máxima en fluido mamario (C_{MAX}) después de la primer dosis fue de 20.9 ± 4.9 $\mu\text{g/mL}$ y 17.1 ± 3.1 $\mu\text{g/mL}$ para Til-LA₂₀₋₁ y Til-LA₂₀₋₂ respectivamente y 14.4 ± 2.1 $\mu\text{g/mL}$ después de la segunda dosis de tilmicosina. Las diferencia entre valores de C_{MAX} de la primer y segunda dosis fue estadísticamente significativa (P<0.05). El tiempo en alcanzar la C_{MAX} fue de 4.1 ± 0.07 y 3.9 ± 0.4 d para la primer dosis (Til-LA₂₀₋₁ y Til-LA₂₀₋₂, respectivamente) y 3.0 ± 0.5 para la segunda dosis y estos valores también fueron estadísticamente diferentes (P<0.05). Los valores de área bajo la curva (AUC) para la unión de las AUCs de las dos inyecciones de

tilmicosina fue de $358.1 \pm 51.4 \mu\text{g/mL}\cdot\text{d}$ y el AUC de la dosis única fue de $177.3 \pm 31.6 \mu\text{g/mL}\cdot\text{d}$ ($P < 0.01$). Estos valores concuerdan con los valores calculados por regla trapezoidal. Por tanto, estos datos no se presentan. El Tiempo medio de residencia (MRT) fue de 5.8 ± 0.9 días después de la primer dosis y 8.3 ± 0.4 después de la segunda, y las comparaciones de estas mostraron que son estadísticamente diferentes ($P < 0.01$).

El promedio de CCS y valores de CMT obtenidas en vacas de los tres grupos en el día de secado y en los días 15 y 30 después del parto se muestran en los cuadros 3.3 y 3.4 respectivamente. El análisis estadístico indica que sólo existe una tendencia a favor de la tilmicosina (dos dosis) en comparación con vacas tratadas con ceftiofur y Til-LA₂₀₋₁. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($P > 0.095$ para ceftiofur y $P > 0.112$ para Til-LA₂₀₋₁).

Los valores de CMT fueron congruentes con los valores del conteo de células somáticas. El análisis de detección de tilmicosina en muestras de leche reveló que el grupo Til-LA₂₀₋₂ tuvo muestras positivas del antimicrobiano hasta por 18 días después del parto, mientras que del grupo Til-LA₂₀₋₁ no se obtuvieron muestras positivas después del parto.

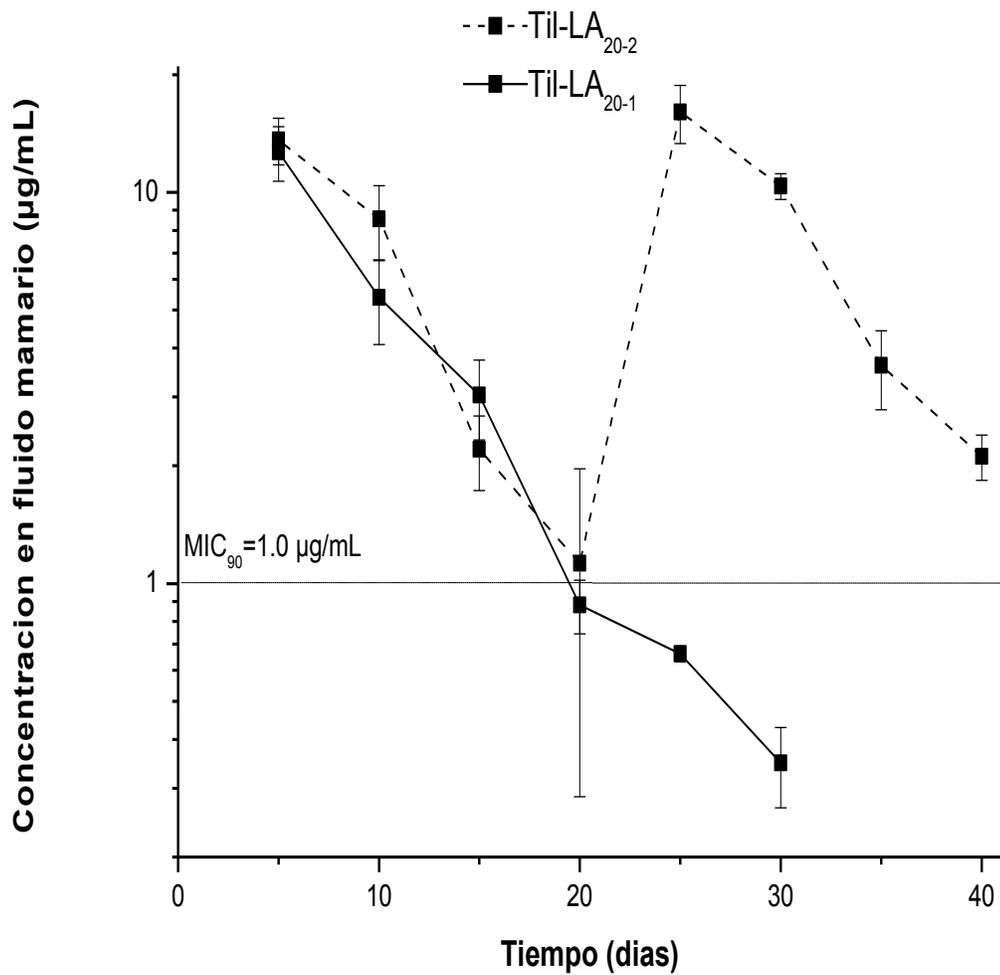


Figura 3.1. Promedio \pm DE de concentraciones de tilmicosina en muestras de fluido mamario, obtenidas de vacas Holstein-Friesian durante el periodo seco después de la administración una dosis (Til-LA₂₀₋₁), o dos dosis (Til-LA₂₀₋₂) de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg SC.

Cuadro 3.1. Parámetros farmacocinéticos de tilmicosina en fluido mamario obtenido de vacas Holstein-Friesian en el periodo seco después de la inyección SC de una dosis o dos dosis de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg.

Variables Farmacocinéticas	Til-LA ₂₀₋₂				Til-LA ₂₀₋₁	
	Promedio 1 ^{er} dosis	± DE	Promedio 2 ^{da} dosis	± DE	Promedio	± DE
T _{1/2β} (d)	4.9 ^{ab}	1.4	7.7 ^a	1.6	4.7 ^b	2.3
C _{MAX} (µg/mL)	20.9 ^a	4.9	17.1 ^{ab}	3.1	14.4 ^b	2.1
T _{MAX} (d)	4.1 ^a	0.7	3.9 ^{ab}	0.4	3.0 ^b	0.5
AUC (µg/mL·d)	242.1 ^b	70.6	358.1 ^a	51.4	177.3 ^b	31.6
AUCt (µg/mL·d)	146.2 ^{ab}	36.1	177.0 ^a	28.0	109.8 ^b	16.1
MRT (d)	5.8 ^b	0.9	8.3 ^a	0.4	6.8 ^b	1.7

* ^{a,b} diferente literal dentro de la fila muestra diferencia estadística significativa (P < 0.05)

† T_{1/2β} = Vida media de eliminación; C_{MAX}= Concentración máxima en fluido mamario; T_{MAX}= Tiempo en alcanzar C_{MAX}; AUC= Área bajo la curva de concentración contra tiempo; AUCt= Área trapezoidal bajo la curva de concentración contra tiempo; MRT= Tiempo medio de residencia.

Til-LA₂₀₋₁ = Inyección SC única de la nueva preparación de tilmicosina (20 mg/kg).

Til-LA₂₀₋₂ = dos inyecciones SC de tilmicosina (20 mg/kg) al inicio del secado y 20 días después.

Cuadro 3.2. Número de casos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium spp.* y *Escherichia coli*, aislados al secado, al parto, 15 y 30 después.

Patógeno	Secado								
	Ceft-LA			Til-LA ₂₀₋₂			Til-LA ₂₀₋₁		
	Antes	Después	% cura	Antes	Después	% cura	Antes	Después	% cura
<i>S. aureus</i>	22	0	100	24	0	100	24	0	100
<i>S. intermedius</i>	8	0	100	8	0	100	8	0	100
SCN	26	0	100	25	0	100	26	0	100
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. uberis</i>	6	0	100	4	1	75	2	0	100
<i>Corynebacterium spp.</i>	-	-	-	2	0	100	4	0	100
<i>E. coli</i>	4	0	100	-	-	-	2	0	100

Cuadro 3.2. Continuación.

Patógeno	Nuevas infecciones intramamarias después del parto																	
	Ceft-LA						Til-LA ₂₀₋₂						Til-LA ₂₀₋₁					
	Parto	%	15 d	%	30 d	%	Parto	%	15 d	%	30 d	%	Parto	%	15 d	%	30 d	%
<i>S. aureus</i>	2	3.5	2	3.5	1	1.7	1	1.7	3	5.17	1	1.7	2	3.5	2	3.5	0	-
<i>S. intermedius</i>	0	-	2	3.5	0	-	0	-	1	1.7	1	1.7	1	1.7	0	-	0	-
SCN	3	5.3	0	0	0	-	0	-	0	-	2	3.4	2	3.5	0	-	0	-
<i>S. dysgalactiae</i>	2	3.5	2	3.5	2	3.5	0	-	0	-	4	6.8	5	8.9	0	-	2	3.5
<i>S. uberis</i>	2	3.5	0	-	6	10.7	4	6.8	2	3.4	2	3.4	0	-	6	10.7	0	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	-	8	16	2	3.5	0	-	2	3.4	4	6.8	0	-	5	8.9	3	5.3
<i>E. coli</i>	8	16	2	3.5	0	-	5	8.6	0	-	0	-	7	12.5	4	7.14	0	-

$\eta = 170$

*SCN = Estafilococos coagulasa negativo

Ceft-LA = Spectramast® DC, ceftiofur de Zoetis, México

Til-LA₂₀₋₁ = Inyección SC única de la nueva preparación de tilmicosina (20 mg/kg)

Til-LA₂₀₋₂ = dos inyecciones SC de tilmicosina (20 mg/kg) al inicio del secado y 20 días después

Cuadro 3.3. Conteo de células somáticas por mililitro de muestras de leche obtenidas de vacas Holstein-Friesian al secado y 15 y 30 días después del parto en vacas tratadas con una o dos dosis, de la nueva preparación de tilmicosina de larga acción a 20 mg/kg SC en comparación con el grupo tratado con ceftiofur.

	Ceft-LA ± DE		Til-LA ₂₀₋₂ ± DE		Til-LA ₂₀₋₁ ± DE	
Secado	335906 ^a	35944	253259 ^a	39638	308697 ^a	33684
15 Días	301484 ^a	35361	170874 ^a	39638	209471 ^a	34073
30 Días	210520 _a	34913	197759 _a	39638	175183 _b	34292

* a,b. Diferente literal dentro de una fila indica diferencia estadística (P< 0.05).

Cuadro 3.4. Proporciones obtenidas de la prueba de California para mastitis de muestras de leche obtenidas al secado y 15 y 30 días después del parto en vacas Holstein-Friesian tratadas con una o dos de tilmicosina a 20 mg/kg SC y ceftiofur 500 mg/glándula.

	Ceft-LA			Til-LA ₂₀₋₂			Til-LA ₂₀₋₁		
	Secado	15 d	30 d	Secado	15 d	30 d	Secado	15 d	30 d
Negativo	41.79	83.58	91.04	80.76	84.61	75	42.85	87.14	94.28
Traza	28.86	10.44	5.97	5.76	9.61	15.38	35.71	0	1.42
1	16.41	1.49	1.49	13.46	5.76	5.76	17.14	5.71	1.42
2	7.46	2.98	0	0	0	0	4.28	4.28	0
3	7.46	1.49	1.49	0	0	0	0	2.85	2.85

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La eficacia de un fármaco antibacteriano para lograr la cura de una IIM determinada, depende de su habilidad para concentrarse en el tejido mamario, difundirse a las áreas infectadas y mantenerse biológicamente activo (Gehring, Smith, 2006). Es de particular importancia los cambios estructurales que tienen lugar, el tejido fibroso invade el área y tiene lugar la formación de microabscesos, como sucede en infecciones por *Staphylococcus aureus* (Nickerson *et al.*, 1999; Sandgren *et al.*, 2008). Además si *Staphylococcus aureus* en su forma “L” intracelular es identificado como patógeno causante de una IIM, la glándula mamaria no responde a los tratamientos, por la capacidad del patógeno de residir a nivel intracelular (Nickerson *et al.*, 1999). Se sabe que los cambios estructurales son comunes durante la IIM por *Staphylococcus aureus* lo que modifica la difusión de los fármacos antimicrobianos a las regiones afectadas de la glándula, esto se ha observado cuando la administración es por vía intramamaria, en estos casos sólo se alcanza una eficacia mínima de cura bacteriológica (Gehring, Smith, 2006), además, la inserción de una cánula durante la administración del fármaco, se ha señalado como una importante causa de IIM (Ziv *et al.*, Gruet *et al.*, 2001; Kalmus *et al.*, 2014).

Con el objetivo de evitar las dificultades mencionadas y obtener una distribución más homogénea del fármaco antimicrobiano, la administración parenteral ha sido probada incluyendo a los macrólidos (Helton-Groce *et al.*, 1993; McDougall *et al.*, 2007). Tilmicosina ha mostrado buena difusión hacia tejido mamario y leche (Scorneaux, Shryock, 1999; Avci, Elmas, 2014), y tiene la capacidad de difundirse hacia el citoplasma de muchas células (Scorneaux, Shryock, 1999). Después de la administración de 10 mg/kg Ziv *et al.*, (1995), encontraron concentraciones útiles para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* por 8 a 9 días en vacas. Por tanto, resulta razonable postular que la administración parenteral de tilmicosina podría

ser capaz de concentrarse en leche y células mamarias y resultar útil para el tratamiento de IIM por *Staphylococcus* spp. (Dingwell *et al.*, 2003; Gruet *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015). En este estudio, dos administraciones de 20 mg/kg SC de tilmicosina con 20 días de diferencia (grupo Til-LA₂₀₋₂) dio lugar a concentraciones en fluido mamario, que de acuerdo con Bonnier *et al.*, (2006), están por encima de la CMI₉₀ para *Staphylococcus aureus* (1.0 µg/mL), si este valor se toma como punto de referencia arbitrario, tilmicosina está por encima de lo referido por más de 40 días en el grupo de Til-LA₂₀₋₂ y 19 días en el grupo Til-LA₂₀₋₁. En contraste, Nickerson *et al.*, (1999), con un tratamiento similar con dos inyecciones del referente de tilmicosina, a una dosis de 5 mg/kg en el día del secado y cuatro días después, encontraron un bajo índice de cura (9.1%), a pesar de que estos autores detectaron concentraciones de tilmicosina en fluido mamario por 25.7 días. Las diferencias en eficacias entre Nickerson *et al.*, (1999) y el 100% de eficacia de este estudio, puede ser explicado en términos de altas concentraciones logradas con la formulación experimental de tilmicosina y por supuesto de la dosis mayor utilizada. Adicionalmente esta diferencia puede ser explicada por el hecho de que por lo menos el 50% de las vacas incluidas en este estudio pueden ser consideradas como jóvenes con un promedio de edad de 3.6 y 3.4 años para Til-LA₂₀₋₂ y Til-LA₂₀₋₁ respectivamente y estaban terminando la primer o segunda lactancia. De acuerdo con Barkema *et al.*, (2006), las vacas más jóvenes tienen mayor probabilidad de ser tratadas con éxito contra IIMs de *Staphylococcus aureus*. No obstante, en estos grupos se incluyeron vacas de 3-5 lactancias y no se observó ninguna diferencia clara en lo que respecta al porcentaje de cura.

Las variables farmacocinéticas básicas en fluido mamario de tilmicosina a 10 mg/kg inyectadas vía subcutánea, son descritos por Ziv *et al.*, (1995) ($T_{1/2\beta} = 33.84 \pm 4.60$ h; $C_{MAX} = 8.21 \pm 2.70$ µg/mL; $T_{MAX} = 24$ h; and $MRT = 76.08 \pm 7.31$ h) fueron estadísticamente menor que los valores obtenidos del grupo Til-LA₂₀₋₁ después de una dosis única de 20 mg/kg ($T_{1/2\beta} = 4.7 \pm 2.3$ d; $C_{MAX} = 14.4 \pm 2.1$ µg/mL; $T_{MAX} =$

3.0 ± 0.5 d; and MRT = 6.8 ± 1.7 d). Presumiblemente la preparación a base de polímeros y la dosis mayor usada pueden contribuir para este efecto. La diferencia estadística de $T_{1/2\beta}$ entre la primer y segunda dosis, pueden explicarse por las concentraciones por encima de la CMI de la primer dosis, que incrementa las concentraciones en fluido mamario de la segunda dosis. Considerando que la tilmicosina ha sido descrita como un fármaco antimicrobiano tiempo dependiente (Adams, 2001), las características farmacocinéticas en leche de la tilmicosina experimental usado en este estudio, cumple mejor con esta clasificación y como tal es mejor opción para la terapia de secado. Esto es particularmente importante para la $T_{1/2\beta}$, cuyo valor se incrementa de aproximadamente 34 h (preparación estándar de tilmicosina) a 113 h de la preparación experimental. Sin embargo, una dosis alta de tilmicosina es necesaria para obtener una buena eficacia.

Dingwell *et al.*, (2003) obtuvieron un 72.5% de eficacia en el tratamiento de IIMs por *Staphylococcus aureus* al administrar tilmicosina como terapia de secado por vía intramamaria. Eficacias similares han sido reportados en el tratamiento intramamario (74.2%) cuando fue administrado 1500 mg/glándula de tilmicosina (Nickerson *et al.*, 1999). Considerando lo anterior, es coherente esperar una eficacia alta en el tratamiento de IIMs causadas por *Staphylococcus* spp. después de utilizar una dosis alta de tilmicosina en este estudio (20 mg/kg) y que fue 100%.

Se han reportado altos índices de eficacia frente a IIMs por *Streptococcus* spp. en los diferentes protocolos usados en la terapia de secado, que van desde un 83 al 100%, y una cura del 100% en el caso de IIMs causadas por *Corynebacterium* spp. y *Escherichia coli* (Halasa *et al.*, 2009c; y Petzer *et al.*, 2009), existe similitud entre estos reportes y los resultados obtenidos en este estudio, este alto índice de eficacia refuerza la idea de ser usado para la terapia de secado en el tratamiento de IIMs de los patógenos más importantes causantes de mastitis.

Otro aspecto importante a considerar en la eficacia del fármaco antimicrobiano después de la terapia de secado es el índice de nuevas infecciones

intramamarias. Los resultados obtenidos en este estudio muestran un 1.7 y 3.5 en el caso de *Staphylococcus aureus*, 0 y 3.5 para SCN, 6.8 y 0 en *Streptococcus uberis* y 8.6 y 12.5 en el caso de *Escherichia coli* en los grupos Til-LA₂₀₋₂ y Til-LA₂₀₋₁. Robert *et al.*, (2006) muestra un análisis cuantitativo de datos de diferentes autores en los que se detallan los índices de nuevas IIMs que fluctúan entre 0.2-5.5, 0-10.2, 1.3-12.9 y 0.8-11 en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., SCN y coliformes respectivamente. De acuerdo a la actividad antimicrobiana de la tilmicosina contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas (Sumano *et al.*, 2015), es razonable atribuirle este efecto observado en muestras obtenidas después del parto. No se encontró diferencia estadística significativa al respecto entre los dos grupos tratados con tilmicosina así como el grupo tratado con ceftiofur. Se han reportado altos porcentajes de cura en el tratamiento de IIMs en el secado mediante la administración de preparados a base de ceftiofur, por lo que los resultados obtenidos en este estudio son congruentes con lo ya reportado (Oliver *et al.*, 2014).

En el CCS, no se encontró diferencia estadística significativa entre los tres grupos. Sin embargo, es posible distinguir una tendencia a favor de los grupos tratados con tilmicosina. Esto también fue reportado por Nickerson *et al.*, (1999) quienes no encontraron diferencias en el CCS en vacas tratadas con tilmicosina o cefapirina benzatínica como terapia de secado, sin embargo, estos autores mencionan que la administración parenteral de tilmicosina disminuye en forma significativa estadísticamente el CCS comparado con la administración intramamaria del mismo fármaco. La irritación causada al contacto directo de la tilmicosina con el epitelio puede explicar este hallazgo. Considerando otros factores ambientales que afectan el CCS, estas observaciones requieren de futuras investigaciones.

El análisis de residuos de tilmicosina mediante la detección microbiológica cuantitativa de fármacos antimicrobianos^m mostró que dos administraciones de la

^m Delvotest®, DSM, Heerlen, Netherlands

preparación experimental a 20 mg/kg y 20 días después (grupo Til-LA₂₀₋₂) aquí evaluadas, resultaron en muestras positivas por 18 días después del parto, resultando impráctico. La dosis única de 20 mg/kg al inicio del periodo seco (grupo Til-LA₂₀₋₁), resultó en valores negativos de tilmicosina al parto y después de este.

Este estudio se llevo a cabo para evaluar la eficacia clínica de la nueva preparación de Tilmicosina de larga acción ^{10-20D} como terapia de secado parenteral mediante la detección de concentraciones terapéuticas de tilmicosina en fluido mamario hasta por 19 días con aplicación de dosis única y por más de 40 días con dos aplicaciones con 20 días de diferencia, y mediante la evaluación microbiológica antes del secado y después del parto el cual mostró una excelente eficacia tanto para los grupos tratados con tilmicosina como para el testigo tratado con ceftiofur. Se realizó el seguimiento del estado de salud de las glándulas mamarias de los tres grupos durante cuatro semanas después del parto mediante evaluación microbiológica, conteo de células somáticas y prueba de California para mastitis para determinar la cura bacteriológica y nuevas infecciones intramamarias.

Los resultados obtenidos en este estudio postulan el uso de esta nueva preparación de tilmicosina con una farmacocinética extendida de larga acción, administrada por vía subcutánea a 20 mg/kg, como una terapia parenteral efectiva en el secado, en particular para tratar IIMs por *Staphylococcus* spp. y prevenir IIMs durante este periodo. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para determinar la eliminación de tilmicosina en leche en varios periodos de secado. Es necesario señalar que este estudio muestra que el ceftiofur intramamario como terapia de secado tuvo una excepcional eficacia con capacidad de curar infecciones de los principales patógenos causantes de mastitis. Esta preparación de fármaco antimicrobiano está aprobada para su uso en todo el mundo para tales

fines, es decir, este estudio no recomienda el uso de esta preparación de tilmicosina experimental sobre un producto aprobado de ceftiofur.

V. REFERENCIAS

1. Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima B, Bage R. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod*, 46:99–105.
2. Adams HR. 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th ed. Iowa State University Press. Ames.
3. Anadón A. 1999. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Research in Veterinary Science*, 66: 197–203.
4. Avci T, Elmas M. 2014. Milk and Blood Pharmacokinetics of Tylosin and Tilmicosin following Parenteral Administrations to Cows. *The Scientific World Journal*, ID: 869096. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/869096>
5. Ballou M. 2012. Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J Anim Sci*, 90:1466–1478.
6. Bar D, Tauer L, Bennett G, González R, Hertl J, Schukken Y, Schulte H, Welcome F, Gröhn Y. 2008. The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *J Dairy Sci*, 91:2205–2214.
7. Barkema H, Green M, Bradley A, Zadoks R. 2009. The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci*, 92(10): 4717–4729.
8. Barkema W, Schukken Y, Zadoks R. 2006. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J Dairy Sci*, 89: 1877–1895.
9. Bonnier M, Doré C, Amédéo J. 2006. *In vitro* activity of tylosin and tilmicosin against cocci isolated from bovine mastitis. *Revue Med Vet*, 157(10): 486-489.
10. Bradley A. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164: 116-128.

11. Bradley A, Green M. 2001. An Investigation of the Impact of Intramammary Antibiotic Dry Cow Therapy on Clinical Coliform Mastitis. *J Dairy Sci*, 84:1632–1639.
12. Bradley A, Green M. 2004. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet Clin Food Anim*, 20: 547–568.
13. Brouillettea E, Grondina G, Shkretaa L, Lacasseb P, Talbota B. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Pathogenesis*, 35: 159–168.
14. Buret A. 2010. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: The example of tilmicosin. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74:1–10.
15. Carter G. 1984. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th ed. EUA. Charles C Thomas Publisher.
16. Chin A, Lee W, Murrin K, Morck D, Merrill J, Dick P, Buret A. 2000. Tilmicosin Induces Apoptosis in Bovine Peripheral Neutrophils in the Presence or in the Absence of *Pasteurella haemolytica* and Promotes Neutrophil Phagocytosis by Macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (9): 2465–2470.
17. Crispie F, Flynn J, Ross P, Hill C, Meaney W. 2004. Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal - a review. *Irish Veterinary Journal*, 57: 412-418.
18. Čulić O, Eraković V, Parnham M. 2001. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *European Journal of Pharmacology*, 429: 209–229.
19. Dingwell RT, Leslie KE, Duffield TF, Schukken Y, DesCoteaux L, Keefe G, Kelton D, Lissemore K, Shewfelt W, Dick P, Bagg R. 2003. Efficacy of Intramammary Tilmicosin and Risk Factors for Cure of *Staphylococcus aureus* Infection in the Dry Period. *J Dairy Sci*, 86: 159–168.

20. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 23(12):2709-28.
21. du Preez J. 2000, Bovine mastitis therapy and why it fails. *S.Afr.vet.Ass*, 71(3): 201–208.
22. Erskine R, Wagner S, DeGraves F. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin Food Anim*, 19: 109–138.
23. Gehring R, Smith G. 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J Vet Pharmacol Therap*, 29: 237–241.
24. Green M, Bradley A, Medley G, Browne W. 2007. Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving. *J Dairy Sci*, 90:3764–3776.
25. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 50(3):245-59.
26. Grummer R. 2007. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period. *Theriogenology*, 685: 5281-5288.
27. Hagnestam C, Emanuelson U, Berglund B. 2007. Yield Losses Associated with Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation. *J Dairy Sci*, 90: 2260-2270.
28. Halasa T, Huijps K, Østerås O. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1):18-31
29. Halasa T, Nielen M, De Roos A, Van Hoorne R, de Jong G, Lam T, van Werven T, Hogeveen H. 2009. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci*, 92:599–606.
30. Halasa T, Nielen M, Whist A, Østerås O. 2009. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. *J Dairy Sci*, 92: 3150–3157.

31. Halasa T, Østerås O, Hogeveen H, van Werven T, Nielen M. 2009. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J Dairy Sci*, 92: 3134–3149.
32. Helton-Groce SL, Thomson TD, Readnour RS. 1993. A study of tilmicosin in milk following subcutaneous administration to lactating dairy cows. *Can Vet J*, 34: 619-621.
33. Hovinen M, Pyörälä S. 2011. *Invited review*: Udder health of dairy cows in automatic milking. *J Dairy Sci*, 94:547–562.
34. Huijps K, Lam J, Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75: 113–120.
35. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. 2015. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Estado de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15042a.html> [consulta: 14 ene 2016].
36. Kalmus P, Simojoki H, Orro T, Taponen S, Mustonen K, Holopainen J, Pyörälä S. 2014. Efficacy of 5-day parenteral versus intramammary benzylpenicillin for treatment of clinical mastitis caused by gram-positive bacteria susceptible to penicillin in vitro. *J Dairy Sci*, 97: 2155–2164.
37. Kasravi R, Bolourchi M, Farzaneh N, Seifi H, Barin A, Hovareshti P, Gharagozlou F. 2011. Conventional and extended intramammary therapy of persistent subclinical mastitis using nafcillin- penicillin-dihydrostreptomycin in lactating dairy cattle. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12 (2): 113-120.
38. Littell C, Milliken AG, Stroup WW, Wolfinger FD. 1996. SAS System for Mixed Models. North Carolina, USA. SAS Inst., Inc. Press. Cary.
39. McDougall S, Agnew EK, Cursons R, Hou X, Compton C. 2007. Parenteral Treatment of Clinical Mastitis with Tylosin Base or Penethamate Hydriodide in Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 90: 779–789.
40. Musal B, İzgür H. 2006. The efficacy of intramammary, systemic and combined antibiotics administered during dry off in cows with subclinical mastitis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 53: 175-178.

41. National Mastitis Council. 2004. Procedures for Collecting Milk Samples. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. <file:///C:/Users/%C3%B1pc1/Desktop/Links%20presentacion%20tesis/Procedures%20for%20Collecting%20Milk%20Samples.html> [consulta: 12 ene 2014].
42. National Mastitis council. 2004. Using Bulk Tank Milk Cultures in a Dairy Practice. <file:///C:/Users/%C3%B1pc1/Desktop/Links%20presentacion%20tesis/Using%20Bulk%20Tank%20Milk%20Cultures%20in%20a%20Dairy%20Practice.html> [consulta: 12 ene 2014].
43. Nickerson C, Owens E, Fox K, Scheifinger C, Shryock R, Spike E. 1999. Comparison of Tilmicosin and Cephapirin as Therapeutics for *Stapylococcus aureus* Mastitis at Dry-off. *J Dairy Sci*, 82: 696-703.
44. Olivares-Pérez J, Eid A, Rojas-Hernández S, Mohamed M, Elghandour Y, Mohamed A, Zaragoza A, Velázquez-Reynoso D, Cipriano-Salazar M, Camacho-Díaz L, Alonso-Fresán M, DiLorenzo N. 2015. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Trop Anim Health Prod*. DOI:10.1007/s11250-015-0890-8.
45. Oliveira L, Hulland C, Ruegg P. 2013. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci*, 96:7538–7549.
46. Oliver SP, Gillespie BE, Headrick SJ, H. Moorehead, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Chester ST, Moseley WM. 2004. Efficacy of Extended Ceftiofur Intramammary Therapy for Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 87: 2393–2400.
47. Owens WE, Nickerson SC, Ray CH. 1999. Efficacy of Parenterally or Intramammarily Administered Tilmicosin or Ceftiofur Against *Staphylococcus aureus* Mastitis During Lactation. *J Dairy Sci*, 82: 645–647.

48. Parker R, Patel R. 1994. Determination of tilmicosin in ovine milk using high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 119:2577-2579.
49. Petzer I-M, Lourens D, van der Schansa T, Watermeyera J, van Reenena R, Rautenbacha G, Thompson P. 2009. Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: efficacy of 6 different dry-cow intra-mammary antimicrobial products. *Jl S.Afr.vet.Ass*, 80: 23–30.
50. Pezeshki A, Capuco A, De Spiegeleer B, Peelman L, Stevens M, Collier R, Burvenich C. 2010. An integrated view on how the management of the dry period length of lactating cows could affect mammary biology and defence. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94: e7–e30. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2010.00991.x
51. Pinedo P, Fleming C, Risco C. 2012. Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies. *J Dairy Sci*, 95: 7015–7026.
52. Pyörälä S. 2002. New Strategies to Prevent Mastitis. *Reprod Dom Anim*, 37: 211–216.
53. Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 34: 565–578.
54. Pyörälä S. 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62: 40-44.
55. Rajala-Schultz P, Gröhn Y, McCulloch C, Guard C. 1999. Effects of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 82:1213–1220.
56. Robert A, H Seegers H, Bareille N. 2006. Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows – a quantitative analysis of published data *Vet. Res.*, 37: 25–48.
57. Royster E, Wagner S. 2015. Treatment of Mastitis in Cattle. *Vet Clin Food Anim*, 31: 17–46.
58. Ruegg P. 2012. New Perspectives in Udder Health Management. *Vet Clin Food Anim*, 28: 149–163

59. Sandgren C, Persson K, Emanuelson U. 2008. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *The Veterinary Journal*, 175: 108–117.
60. SAS. 2012. SAS User's Guide: Statistics (Version 9.1.3). NC, USA. SAS inst. Inc. Cary.
61. Scorneaux B, Shryock RT. 1999. Intracellular Accumulation, Subcellular Distribution, and Efflux of Tilmicosin in Bovine Mammary, Blood, and Lung Cells. *J Dairy Sci*, 82:1202–1212.
62. Sérieys F, Raguet Y, Goby L, Schmidt H, Friton G. 2005. Comparative Efficacy of Local and Systemic Antibiotic Treatment in Lactating Cows with Clinical Mastitis. *J Dairy Sci*, 88: 93–99.
63. Soriano ZR. 2012. Diseño y evaluación farmacocinética y cardiotoxicológica de un preparado de tilmicosina de larga acción extendida en bovinos. [tesis de maestría]. México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México
64. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. 2015. Tratamiento de las mastitis. En *Farmacología Veterinaria*. 4ª edición, Ciudad de México, México.
65. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard B. 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Frontiers in immunology*, 5: 1-10.
66. Wang W, Song Y, Petrovski K, Eats P, Trott D, Wong H, Page S, Perry J, Garg S. 2015. Development of intramammary delivery systems containing lasalocid for the treatment of bovine mastitis: impact of solubility improvement on safety, efficacy, and milk distribution in dairy cattle. *Drug Design, Development and Therapy*, 9: 631–642.
67. Zalewska-Kaszubska J, Górska D. 2001. Anti-inflammatory capabilities of macrolides. *Pharmacological Research*, 44(6): 451-454.
68. Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J Anim Sci*, 86: 57–65

69. Ziv G, Shem-Tov M, Glickman A, Winkler M, Saran A. 1995. Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J Vet Pharmacol Ther*, 18(5):340-345.