

Departament de Farmacologia, Terapèutica i de Toxicologia
Facultat de Veterinària



Universitat Autònoma de Barcelona

***FARMACOCINÈTICA Y EFICACIA DE OXITETRACICLINA
TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR
EN BOVINO. DEPLECIÓN TISULAR***



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

Ghizlane El korchi

Octubre 2006

El trabajo “**Farmacocinética y eficacia de oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovino. Depleción tisular**” realizado por **GHIZLANE EL KORCHI** para optar al grado de doctora en Farmacología, se ha llevado a cabo en el Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, bajo la dirección de las Dras. **Margarida Arboix Arzó y Belén Pérez Fernández**, las cuales autorizan su presentación.

Dra. Margarida Arboix Arzo

Dra. Belén Pérez Fernández

Bellaterra, 26 de septiembre de 2006

*“Nada en la vida hay que temer. Sólo
hay que entenderlo »*

Marie Curie

DÉDICACES

A mes chers parents

Vous avez consentis d'énormes sacrifices pour mon éducation, ma formation et mon bonheur. Votre amour pour moi a toujours été si grand, si magnifique qu'il m'apportait refuge, consolation et soutiens. Aucune dédicace ne saurait vous exprimer la profondeur de mon amour et ma reconnaissance, aucun mot, aucune parole ne saurait exprimer l'adoration que j'ai pour vous.

Que Dieu vous garde et puisse m'aider à ne jamais vous décevoir.

A mon cher frère Jawad

Je ne saurai te remercier du soutien que tu m'as toujours apporté.

A ma chère sœur Hanane et son mari Karim

J'ai la chance de t'avoir comme sœur et comme amie et Karim comme beau frère, Je vous témoigne mon affection, et je vous souhaite à votre nouvelle petite famille tout le bonheur du monde.

A ma chère sœur Imane

Avec toute la tendresse que tu me réserve, je te souhaite la réussite dans ta vie et beaucoup de triomphe et d'ardeur dans tes études.

A ma chère tante khadouj

Que ce travail puisse exprimer toute mon affection et mon attachement

A ma chère grande mère

Avec tout mon amour et mon estime, je te dédie ce travail et je te souhaite une longue vie pleine de santé et de sérénité.

A la mémoire de mes grands pères et grande mère

Pour vos âmes toujours vivantes. Vos corps nous ont quittés mais vos esprits, vos âmes sont toujours présentes avec nous. Je prie Dieu que vos âmes reposent en paix.

A tout mes oncles, tantes, ainsi que leurs épouses et époux

En témoignage de ma gratitude et de mes impressions les plus distinguées je vous souhaite une vie heureuse et beaucoup de bonheur.

A toute la famille grands et petits, que ces modestes lignes leur servent de témoignage à mon attachement indéfectibles au lien sacré de la famille.

A tous mes amis

Je veux également remercier mes amis du Maroc (Hicham Noura, Mohamed Azdi, Driss Taoutaou, Youssef, Mounia Khaled et son mari Moanis) pour leur amitié inconditionnelle et je souhaite que notre relation perpétuera et que se consolidera davantage avec le temps.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha llegado a su fin. Ahora que puedo pararme y mirar atrás, siento que el camino recorrido ha valido la pena. Este período ha sido intenso: la tesis no sólo significa el final de un trabajo de investigación y de formación científica, sino también una enriquecedora etapa de mi vida personal.

Aunque es difícil resumir en unas líneas las vivencias, sensaciones y sentimientos que han acompañado al trabajo de cada día, ahora tan sólo me gustaría dar las gracias a todas las personas que han formado parte de mi vida en estos años y que de una u otra forma, han estado a mi lado y han hecho posible que llegara este momento.

En primer lugar quiero agradecer a la Margarida Arboix la posibilidad que me brindó para que pudiera realizar esta tesis doctoral, y por sus comentarios y aportaciones a lo largo de la redacción de la tesis.

Quiero agradecer de forma especial a Belén Pérez todo el tiempo que me ha dedicado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por su apoyo incondicional y su amistad.

A mis compañeros del *Servei d'Anàlisi de Fàrmacs*, especialmente Carme, Magda, Pilar y Gloria, que junto con Victoria Clos he compartido despacho e incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos momentos y vuestra amistad, por aguantarme y apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida. Me siento muy afortunada de haberos conocido.

Un agradecimiento especial a toda la gente del Departamento de Farmacología y una mención expresa para Paco, Montse, Carina, Sergi y Jordi, por su ayuda técnica y administrativa que me han hecho más llevadera la parte experimental y burocrática. A todos ellos, por los buenos momentos y la amistad brindada.

Se suele decir que amigos de verdad hay pocos. Quizás no sepa distinguir los amigos de verdad de los simplemente amigos, pero me creo afortunada por contar con todos ellos y por la ayuda que he recibido a lo largo de todos estos años.

Seguramente me olvidaré de alguien (espero que no) y por ello también espero que no me lo tengáis en cuenta.

A mi amiga Lamya por estar siempre a mi lado durante todos estos años. A su marido y amigo Oscar, por llevarme siempre la contraria y meterse conmigo. A mi amiga Mónica, por su apoyo y confianza incondicionales. A Nicolás, por su amistad, cariño y paciencia. A Esther, por su amistad y por escucharme. A Amine, por su alegría y vitalidad que me ha sabido transmitir. Sin olvidar a M^a Dolores por su paciencia y por saber convivir conmigo durante este último año.

Y por último, no por ello menos importante, a Ahmed, Dalia, Karima, Rachid, Fátima, Islam, Mostapha, Aziz, Ilham, Ismael, por todo el cariño que me dan y por estar siempre ahí.

A todos los que de una forma u otra estuvieron conmigo a lo largo de estos años, a todos gracias.

Indice

INDICE	I
ABREVIACIONES	IX
I- INTRODUCCIÓN	1
I. 1. TETRACICLINAS	9
I.1.1. ORIGEN	9
I.1.2. ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS	9
I.1.3. MECANISMO DE ACCION	11
I.1.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	13
I.1.5. RESISTENCIA BACTERIANA	16
I.1.6. FARMACOCINETICA	16
I.1.6.1. <i>Absorción</i>	17
I.1.6.2. <i>Distribución</i>	19
I.1.6.3. <i>Metabolismo</i>	21
I.1.6.3. <i>Eliminación</i>	21
I.1.7. INTERACCIONES FARMACOLOGICAS	23
I.1.8. UTILIZACION CLINICA	23
I.1.9. REACCIONES ADVERSAS	26
I.1.10. TOXICIDAD	27
I.1.11. EPIMERIZACION DE LAS TETRACICLINAS	28
I.1.12. ESTUDIOS DE RESIDUOS.....	29
I.1.12.1. <i>Introducción</i>	29
I.1.12.2. <i>Nivel sin efecto tóxico observable (NOEL)</i>	30
I.1.12.3. <i>Ingesta diaria aceptable (IDA)</i>	30
I.1.12.4. <i>Límites máximos de residuos (LMR)</i>	31
I.1.12.5. <i>LMR de la Oxitetraciclina</i>	32
I.1.12.6. <i>Tiempo de espera</i>	33
II- OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
III.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA EN BOVINO	41
III.1.1. ESTUDIO PREVIO	41
III. 1.1.1. <i>Formulaciones de OTC empleadas</i>	41
III. 1.1.2. <i>Animales</i>	41
III. 1.1.3. <i>Dieta</i>	41
III. 1.1.4. <i>Protocolo experimental</i>	41

III. 1.1.5. Análisis de las concentraciones de OTC en muestras de plasma bovino.	43
III. 1.1.6. Cuantificación de las concentraciones de OTC en el plasma de animales tratados	43
III. 1.1.7. Tratamiento cinético no compartimental.....	43
III.1.2. ESTUDIO DEL PERFIL CINETICO DE OXITETRACICLINA ADMINISTRADA POR VIA INTRAMUSCULAR EN TERNERAS.	44
III. 1.2.1. Formulaciones de OTC empleadas.....	45
III. 1.2.2. Animales	45
III. 1.2.3. Dieta	45
III. 1.2.4. Protocolo experimental	45
III. 1.2.5. Análisis cromatográfico de las concentraciones de OTC en el plasma.....	46
III. 1.2.6. Cuantificación de las concentraciones de OTC en plasma de ternera.....	46
III. 1.2.7. Tratamiento cinético no compartimental.....	46
III. 1.2.8. Ensayo de bioequivalencia	46
III.1.3. EVALUACION DE LA EFICACIA TERAPEUTICA	49
III.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC EN BOVINO	50
III.2.1. FORMULACIONES DE OTC EMPLEADAS	50
III.2.2. ANIMALES	50
III.2.3. DIETA	50
III.2.4. TRATAMIENTO Y SACRIFICIO	50
III.2.5. ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LAS CONCENTRACION DE OTC + 4-EPIOTC EN TEJIDOS DIANA DE BOVINO	51
III.2.6. PREPARACION DEL TEJIDO Y EXTRACCION DE LA OTC + 4-EPIOTC	51
III.2.7. CUANTIFICACION DE LAS CONCENTRACIONES TISULARES DE OTC + 4-EPIOTC EN LOS ANIMALES TRATADOS	51
III.2.8. CALCULO DEL TIEMPO DE ESPERA	51
IV. RESULTADOS	53
IV.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR A TERNERAS.	55
IV.1.1. ESTUDIO PREVIO DEL PERFIL CINETICO DE OXITETRACICLINA ADMINISTRADA POR VIA I.M. EN TERNEROS	55
IV.1.1.1. Concentraciones plasmáticas	55
IV.1.1.2. Estudio farmacocinético	58
IV.1.2. ESTUDIO DEL PERFIL CINETICO DE OXITETRACICLINA ADMINISTRADA POR VIA I.M. EN TERNERAS.	60
IV.1.2.1. Concentraciones plasmáticas	60
IV.1.2.2. Estudio farmacocinético	75
IV.1.2.3. Análisis estadístico de la bioequivalencia	79

IV.1.2.4. Cálculo de la eficacia frente los diferentes microorganismos causantes de enfermedades en bovino.	79
IV.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC + 4-EPIOTC EN TERNERAS	83
IV.2.1. ESTUDIO DE RESIDUOS EN TERNERA.	83
IV.2.1.1. Concentraciones tisulares.....	83
IV.2.1.2. Cálculo del tiempo de espera.....	87
V. DISCUSIÓN.....	89
V.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA TRAS SU ADMINISTRACIÓN I.M. EN TERNEROS.	91
V.1.1. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE OTC EN PLASMA DE TERNERAS.....	91
V.1.2. ANÁLISIS DE LA BIOEQUIVALENCIA	95
V.1.3. EFICACIA TERAPÉUTICA.....	96
V.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC+4-EPIOTC EN TERNEROS	100
V.2.1. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC+4-EPIOTC EN TERNEROS.....	100
V.2.2. TIEMPO DE ESPERA	102
VI. CONCLUSIONES.....	105
VII. BIBLIOGRAFIA	109
VIII. ANEXO.....	131
“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE OXITETRACICLINA EN PLASMA Y TEJIDOS DE BOVINO”.....	133
VIII.1. INTRODUCCIÓN.....	135
VIII.1.1 ANTECEDENTES	135
VIII.1.1.1. Métodos analíticos de detección y cuantificación de OTC	135
VIII.1.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	139
VIII.1.2.1. Definiciones	139
VIII.1.2.2 Cálculo de los parámetros	141
VIII.2. OBJETIVOS.....	143
VIII.3. MATERIAL Y MÉTODOS	144
VIII.3.1. MATERIAL Y METODO ANALITICO DE OTC EN PLASMA	144
VIII.3.1.1. Reactivos	144
VIII.3.1.2. Soluciones	144

VIII.3.1.3. Patrones	144
VIII.3.1.4. Material fungible.....	145
VIII.3.1.5. Instrumentación.....	145
VIII.3.1.6. Condiciones cromatográficas	146
VIII.3.1.7. Preparación de las escalas de calibración	146
VIII.3.1.8. Tratamiento de las muestras de plasma.....	146
VIII.3.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE OTC EN PLASMA BOVINO.....	148
VIII.3.2.1. Linealidad intradía.....	148
VIII.3.2.2. Linealidad interdía.....	148
VIII.3.2.3. Selectividad y especificidad	148
VIII.3.2.4. Precisión y exactitud.....	149
VIII.3.2.5. Límite de cuantificación.....	149
VIII.3.2.6. Límite de detección	149
VIII.3.2.7. Estabilidad.....	149
VIII.3.3. MATERIAL Y METODOS ANALITICOS EN TEJIDOS BOVINO.....	150
VIII.3.3.1. Reactivos	150
VIII.3.3.2. Soluciones	150
VIII.3.3.3. Patrones.	150
VIII.3.3.4. Material Fungible	151
VIII.3.3.5. Instrumentación.....	151
VIII.3.3.6. Condiciones cromatográficas.	152
VIII.3.3.7. Preparación de las escalas de calibrado	152
VIII.3.3.8. Preparación del tejido y extracción de la OTC + 4-epiOTC.....	152
VIII.3.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO EN TEJIDOS BOVINO.....	155
VIII.3.4.1. Linealidad	155
VIII.3.4.2. Precisión y exactitud.....	156
VIII.3.4.3. Límite de cuantificación.....	157
VIII.3.4.4. Límite de detección	157
VIII.3.4.5. Estabilidad.....	157
VIII.4. RESULTADOS.....	159
VIII.4.1. VALIDACION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE LA OTC EN PLASMA DE TERNERA. .	159
VIII.4.1.1 Linealidad	159
VIII.4.1.2. Selectividad y especificidad	159
VIII.4.1.3. Precisión y exactitud.....	161
VIII.4.1.4. Limite de cuantificación.....	161
VIII.4.1.5. Limite de detección	162
VIII.4.1.6. Estabilidad.....	162
VIII.4.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE OTC + 4 EPIOTC EN DIFERENTES TEJIDOS DE BOVINO.	162
VIII.4.2.1. Linealidad	162

VIII.4.2.2. <i>Precisión y Exactitud</i>	164
VIII.4.2.3. <i>Límite de cuantificación</i>	166
VIII.4.2.4. <i>Limite de detección</i>	166
VIII.4.2.5. <i>Especificidad</i>	166
VIII.4.2.7. <i>Estabilidad</i>	171

Abreviaciones

AUC	Área Bajo la Curva
C _{max}	Concentración máxima
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTC	Clortetraciclina
CV	Coefficiente de Variación
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary
DC	Doxiciclina
D.E.	Desviación Estándar
EC	Electroforesis capilar
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EFS	Extracción en Fase Sólida
EMEA	European Medicines Agency
EPA	Efecto Postantibiótico
E.R.M	Error Relativo Medio
FDA	Food and Drug Administration
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenosa
LQ	Límite de cuantificación
LD	Límite de Detección
LMR	Límite Máximo de Residuo

MRT	Tiempo Medio de Residencia
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NOEL	Dosis sin efecto observado
OIE	Organización Mundial de la sanidad animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTC	Oxitetraciclina
4-epiOTC	4-epímero Oxitetraciclina
PK/PD	Farmacocinética/Farmacodinamia
P.V.	Peso Vivo
S	Pendiente media
t_{\max}	Tiempo de concentración máxima
$T_{1/2}$	Semivida biológica
TC	Tetraciclina
UV	Ultravioleta
UE	Unión Europea
Vd_{ss}	Volumen de distribución en el estado de equilibrio estacionario

I- INTRODUCCIÓN

Los antibacterianos son, entre las sustancias descubiertas por el hombre, probablemente las que más han aportado al bienestar de la salud de la humanidad y de los animales. A pesar de ello, la utilización de los antibióticos no está exenta de problemas (toxicidad, hipersensibilidad, etc.). Así, los antibióticos se encuentran entre las posibles causas que pueden originar la presencia de residuos en los productos alimenticios, además de la gran problemática destacada en los últimos años y relacionada con su pérdida de eficacia, debido a la emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antibacterianos de uso clínico.

El uso de antibióticos en producción animal ha tenido históricamente un enfoque doble; por un lado su empleo terapéutico y por otro su empleo como promotor del crecimiento. Los antibacterianos promotores del crecimiento son un grupo reducido y muy concreto de moléculas que se han empleado desde hace más de 30 años en producción animal con el objetivo fundamental de mejorar el crecimiento. Inicialmente no se plantearon restricciones para el uso de antibacterianos promotores de crecimiento y por tanto cualquier antibacteriano que pudiera suministrarse con el pienso podía emplearse como promotor de crecimiento. Sin embargo, el progresivo aumento en el uso de antibióticos, tanto en medicina humana como en veterinaria y agricultura, fue dando lugar a la selección de bacterias resistentes y por lo tanto la utilidad clínica de algunos de ellos comenzó a disminuir. Aunque este problema se detectó en el ámbito humano, los antimicrobianos no sólo se utilizan en personas, y por ello se empezó a cuestionar si su uso en animales y en la agricultura podía ser responsable de esta situación, discutiéndose especialmente el papel de los antimicrobianos empleados como promotores del crecimiento.

En 1969 en el Reino Unido, el informe Swann recomendó que para paliar en parte estos problemas, se diferenciaron claramente los antibacterianos en función de su uso en medicina humana, medicina animal y promoción del crecimiento y que para este último fin no se utilizaran los antibacterianos empleados en personas. Por tanto, en este informe se recomendó por ejemplo, que se prohibiera el uso de penicilinas y tetraciclinas como promotores de crecimiento. Como consecuencia de toda esta problemática el Reglamento CE 1831/2003 del 22 Septiembre sobre los aditivos en la alimentación animal prohíbe el uso de medicamentos veterinarios como aditivos en el pienso (excepto coccidiostáticos e histomonostatos).

Diversos organismos nacionales e internacionales han elaborado informes al respecto (OMS, OIE, EMEA, etc.). Todos ellos coinciden en sus conclusiones en tres recomendaciones principales:

- Es imprescindible instaurar sistemas de vigilancia de resistencias en bacterias de origen humano y animal.
- Es indispensable disponer también de datos del consumo de antibacterianos en producción animal.
- Hay que potenciar la difusión y la aplicación de los principios de uso prudente de antibióticos.

Por otro lado, se ha de considerar que para la selección de un tratamiento antibacteriano óptimo es preciso considerar simultáneamente una serie de principios relacionados tanto con las características microbiológicas como con las propiedades farmacocinéticas de los agentes antibacterianos disponibles. Los criterios microbiológicos informan sobre la mayor o menor sensibilidad del germen responsable de la infección a tratar, mientras que los parámetros farmacocinéticos proporcionan información sobre la potencial capacidad de acceso y permanencia del fármaco en los espacios corporales infectados.

La consideración de estos factores llevan, en la práctica clínica, al tratamiento individualizado mediante el uso de unos parámetros que se llaman índices de eficacia (Schentag y cols., 1992). Estos índices, basados en los parámetros microbiológicos y farmacocinéticos, proporcionan información sobre la eficacia potencial de un determinado tratamiento.

El objetivo de la individualización posológica, es diseñar el régimen de dosificación que proporcione las concentraciones plasmáticas efectivas. Estas concentraciones dependen tanto de las características del paciente como del tipo de patógeno causante de la infección. Hay que destacar que en una patología infecciosa la respuesta al tratamiento es el resultado de la interacción bacteria-paciente-fármaco por lo que además de la variabilidad farmacocinética hay que considerar la variabilidad farmacodinámica.

Como consecuencia, de la combinación de estos diferentes conceptos, surgió el análisis farmacocinético-farmacodinámico (pK-pD), con el objetivo de determinar la dosis óptima que permite la máxima eficacia y al mismo tiempo minimiza el desarrollo de las resistencias.

Para evaluar estas relaciones, es imprescindible conocer la actividad antibacteriana frente a los diferentes patógenos, es decir, la sensibilidad de la bacteria respecto al antibacteriano.

Entre los parámetros microbiológicos a considerar cabe citar los siguientes:

- *Concentración mínima inhibitoria (CMI)*: es la concentración mínima del antibacteriano necesario para impedir el crecimiento de los microorganismos después de 18-24 horas de incubación con la inoculación de microorganismos de 10^4 a 10^5 UFC (Reese y Douglas, 1987). Es una medida bacteriostática que se refiere a la inhibición del desarrollo de la bacteria y se expresa como una concentración (μg , UI, $\mu\text{mol/ml}$). Dependiendo del grado de inhibición del crecimiento de microorganismos se obtendrá la CMI_{50} , CMI_{75} , CMI_{90} o CMI_{100} , según si la inhibición es del 50, 75, 90 o 100% (Dámaso, 1990).
- *Concentración mínima bactericida (CMB)*: es la concentración mínima del antibacteriano que causa la destrucción completa del microorganismo o que permite la supervivencia de $< 0.1\%$ de la inoculación inicial en condiciones experimentales estándares (Reese y Douglas, 1987).

Los antibióticos bactericidas tienen valores similares de CMI y de CMB como en el caso de β -lactámicos y fluoroquinolonas (Chow y cols., 1985).

Cada antibiótico tiene un valor crítico de CMI o CMB que permite clasificar las cepas como sensibles o resistentes a partir de la base de si el valor obtenido es mayor o menor que el valor crítico. Este valor es difícil de determinar y se calcula a partir de la eficacia del antibiótico en infecciones causadas por el patógeno en cuestión. Además, la respuesta del paciente depende de diferentes factores y eso dificulta la determinación de este valor crítico.

Otro factor inherente que limita el uso de estos parámetros como indicadores del potencial de un determinado tratamiento antibacteriano, es que estas determinaciones se realizan bajo condiciones experimentales de inoculación menores a las implicadas en una infección real y con microorganismos en fase de rápido crecimiento, mientras que *in vivo* las condiciones son diferentes.

- *Relación bactericida*: esta relación se calcula a partir de la curva que relaciona el n° de bacterias supervivientes respecto al tiempo. Hay dos tipos de cinéticas bactericidas, la cinética concentración-dependiente, en la que el aumento de la concentración antibacteriana aumenta la relación bactericida y la cinética concentración-independiente, en que la relación bactericida se mantiene constante por debajo de un valor determinado, independientemente de la concentración del antibiótico.
- *Efecto postantibiótico (EPA)*: es la persistencia de la inhibición del crecimiento bacteriano después de la exposición de la bacteria al antibiótico cuando éste ya no es detectable (Spivey, 1992). Este efecto se observa en todos los antibióticos, aunque no todos provocan este efecto en todos los microorganismos. Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, DNA y RNA (aminoglucosidas, tetraciclinas, quinolonas, metronidazole, chloranfenicol, trimetoprim) presentan un efecto postantibiótico frente a la mayoría de bacterias. Los antibióticos que inhiben la síntesis de la membrana celular (β -lactámicos, glicopeptidos) provocan un moderado efecto postantibiótico en estafilococos, un bajo efecto postantibiótico en estreptococos y un mínimo efecto postantibiótico en bacterias gram-negativas.

La duración de este efecto varía de un fármaco a otro y es dependiente de la cepa de microorganismos. El efecto postantibiótico no se puede predecir con la CMI y CMB y se tiene que determinar en cada caso por modelos *in vivo* e *in vitro*.

El éxito de la terapia antimicrobiana no depende solamente de la actividad antibacteriana del fármaco. El perfil cinético tiene una gran importancia, decisiva en la respuesta final de un tratamiento, de ello depende la concentración en el lugar de la infección. Por esta razón, se considera que algunos parámetros farmacocinéticos dan información para conocer la intensidad del contacto antibiótico-bacteria. Para valorar cuantitativamente la eficacia de los tratamientos de diferentes fármacos se tienen que

calcular diferentes índices de la relación entre algunos parámetros microbiológicos y algunos parámetros farmacocinéticos. Estos índices permiten fijar la pauta posológica más adecuada. De estos parámetros los más importantes son:

- AUC_{0-24h}/CMI : Relación del área bajo la curva concentración-tiempo y la concentración mínima inhibitoria.
- C_{max}/CMI : Relación de la concentración plasmática máxima y la concentración mínima inhibitoria.
- $T>CMI$: Intervalo posológico durante el cual los niveles plasmáticos están superiores al valor de la CMI.

De acuerdo con el tipo de antibiótico, hay parámetros que indican mejor la eficacia de un fármaco que otros. Así, para los antibióticos concentración-dependientes, el parámetro más adecuado es C_{max}/CMI , en cambio para los antibióticos tiempo-dependiente es $T>CMI$ y AUC_{0-24h}/CMI en el caso de los antibióticos de tiempo dependiente con efecto prolongado.

En el caso de las tetraciclinas, se consideran antibacterianos del grupo tiempo dependiente con un largo EPA (Craig, 2003), así que el parámetro que mejor determina su eficacia es AUC_{0-24h}/CMI .

Por otro lado, a lo largo de los años se ha asistido a la evolución de la problemática relacionada con la aparición de reacciones adversas en humanos, ocasionadas por la presencia de contaminantes en los alimentos. Los medicamentos utilizados en los animales productores de alimentos pueden llegar a los consumidores a través de la cadena alimentaria y tener consecuencias negativas para la salud pública.

Con el objetivo de evaluar este riesgo y preservar la salud humana, se activaron programas para el control del riesgo de los diferentes contaminantes ambientales y progresivamente se fueron analizando sustancias utilizadas en el tratamiento de patologías animales que mediante la cadena alimentaria podían acceder al intestino humano.

A finales de 1981, la CEE presentó las primeras Directivas en relación a los medicamentos de uso veterinario y en 1990, apareció en Europa la primera Directiva que fija los criterios para establecer los límites máximos de residuos aceptables para

cada molécula y sus metabolitos, susceptibles de ser utilizada en terapéutica animal, sin riesgo para la salud del consumidor. La evaluación de la seguridad de los aditivos y contaminantes de los alimentos se ha basado en la determinación de un nivel sin efecto para cada sustancia y el establecimiento de factores de seguridad que permiten fijar una cantidad de sustancia activa que al ser ingerida diariamente por el hombre no significa ningún riesgo para su salud.

I. 1. TETRACICLINAS

I.1.1. Origen

El origen de este grupo de antibióticos se remonta a las investigaciones llevadas a cabo por el profesor Duggar de la Universidad de Wisconsin, en colaboración con los Laboratorios Lederle de Pearl River. Con el fin de hallar un compuesto más seguro que la estreptomina para el tratamiento de la tuberculosis, el profesor Duggar analizó una gran variedad de muestras de suelos procedentes de distintas partes del mundo. Así, en el verano de 1945, Duggar aisló un actinomiceto dorado con actividad antibacteriana, al que nombró *Streptomyces aureofaciens*. El antibiótico aislado de este microorganismo recibió el nombre de aureomicina y pudo observarse que se trataba de un compuesto con un amplio espectro de actividad. En 1948 empezó la producción a gran escala de este compuesto. Sin embargo, hasta 1952 no pudo establecerse su estructura química y la aureomicina recibió el nombre de clortetraciclina (CTC).

En 1950, tras el análisis de gran cantidad de muestras de suelos, se aisló a partir de *Streptomyces rimosus* la oxitetraciclina (OTC) con características y propiedades similares a la clortetraciclina. En 1953, mediante la eliminación del átomo de cloro de la clortetraciclina se obtuvo la tetraciclina (TC) (Sneader, 1996). La demeclociclina (DMC) fue aislada en 1957 de una cepa mutante de *Streptomyces aureofaciens*.

Entre los años 1960-1966 se realizaron modificaciones químicas de las moléculas naturales, obteniendo generalmente antibióticos semisintéticos con una mayor liposolubilidad relativa (Metaciclina en 1961; Doxiciclina en 1963 y Minociclina en 1964). Estas modificaciones mejoraron las características farmacocinéticas y la eficacia de este grupo de antibióticos y cambiaron el perfil y algunos aspectos toxicológicos de este grupo de antibióticos.

I.1.2. Estructura y características fisicoquímicas.

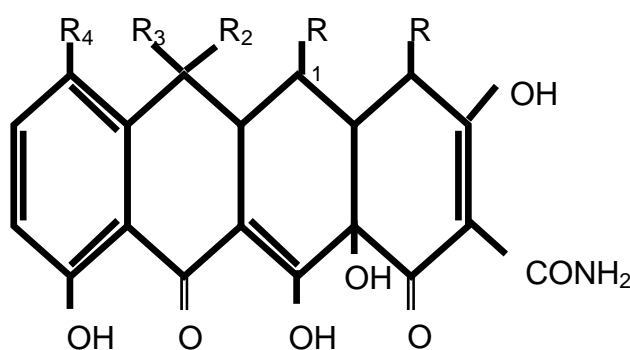
Las tetraciclinas son sustancias cristalinas ligeramente amarillas, sin olor y levemente amargas; son anfóteras ya que en solución acuosa forman sales tanto con ácidos como con bases. Son estables en forma de polvo pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestables a pH superiores a 7.0. Se destruyen con soluciones ácidas de pH inferiores a 2.

En pH ácido se disuelven poco, pero pueden combinarse con sodio o clorhidrato, lo que las hace más solubles. En solución acuosa neutra, la CTC pierde la mayor parte de su actividad en un día; la OTC en tres o cuatro días y la TC en unas tres semanas.

Tal como su nombre genérico indica, se trata de un grupo de antibióticos de estructura tetracíclica (Fig. 1). Los requerimientos mínimos que una tetraciclina necesita para llevar a cabo su actividad biológica coinciden con su estructura básica, es decir, el núcleo policíclico de naftacenocarboxamida.

Existen dos regiones diferenciadas en la molécula que contienen distintos grupos funcionales.

Figura 1. Fórmulas estructurales de las tetraciclinas (Prescott y Baggot, 2000).



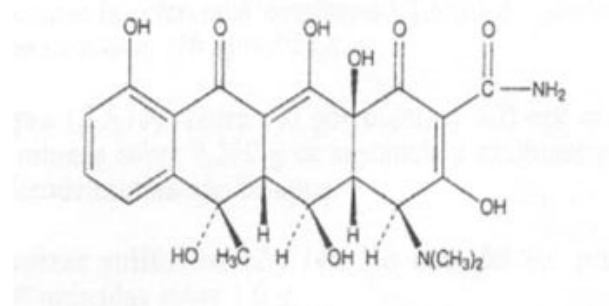
Tetraciclina	R	R₁	R₂	R₃	R₄
Clortetraciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	Cl
Oxitetraciclina	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃	OH	H
Tetraciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	H
Demeclociclina	N(CH ₃) ₂	H	H	OH	Cl
Minociclina	N(CH ₃) ₂	H	H	H	N(CH ₃) ₂
Doxiciclina	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃	H	H
Metaciclina	N(CH ₃) ₂	OH	=CH ₃	-	H

Las tetraciclina poseen en la parte inferior de la molécula una serie de grupos funcionales de oxígeno (Nelson, 1998). La mayoría de las modificaciones sintéticas a lo largo de esta región implican una pérdida de la actividad biológica. Sin embargo, las

modificaciones sintéticas realizadas en la región superior de la molécula dan lugar a nuevos compuestos con una mayor actividad biológica y en algunos casos con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes a otras tetraciclinas. Además, la alteración de los grupos funcionales de esta región puede inducir cambios en el tamaño, forma, carga, densidad electrónica y polaridad. Dichas modificaciones estructurales conducen a cambios en la solubilidad, lipofilia e incluso en la afinidad con sus moléculas diana. Sin embargo, las tetraciclinas con actividad antibacteriana, en general, sólo difieren entre ellas por sus características farmacocinéticas.

La oxitetraciclina es la (4S, 4aR, 5S, 5aR, 6S, 12aS)-4-dimetilamino-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi -6 -metil - 1, 11 - dioxo- 1, 4, 4a,5,5a,6,11,12,12a-octahidronaftaceno-2-carboxamida, sustancia producida por el crecimiento de ciertas cepas de *Streptomyces rimosus* u obtenida por cualesquiera otros medios (Fig. 2).

Figura 2. Estructura química de la oxitetraciclina (Farmacopea Española 1997).



C₂₂H₂₄N₂O₉

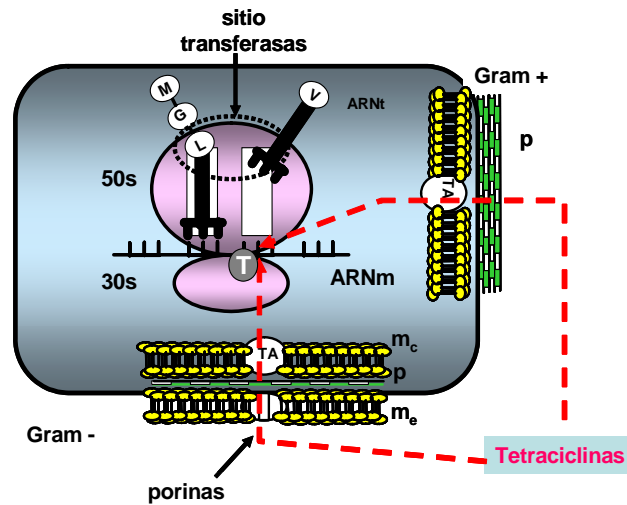
La OTC es un polvo cristalino amarillo, muy poco soluble en agua, se disuelve en disoluciones diluidas de ácidos o bases.

I.1.3. Mecanismo de acción

Las tetraciclinas son antibióticos de acción bacteriostática. Esta acción se halla asociada a una inhibición de la síntesis proteica bacteriana en el proceso de reproducción y crecimiento celular, al ligarse al ribosoma bacteriano 30S (Connamacher y Mandel, 1965) y evitar la llegada del complejo aminoacil RNAt al sitio aceptor (A) en el complejo RNAm-ribosoma (Fig. 3). Esta unión irreversible impide de forma eficaz la

incorporación de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídica, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas (Schnappinger y Hillen, 1996).

Figura 3. Inhibición de la síntesis proteínica bacteriana por parte de las tetraciclinas



Para que los antibióticos lleguen a los ribosomas se necesitan como mínimo dos procesos. El primero es la difusión pasiva a través de los canales hidrófilos formados por las proteínas porinas de la membrana externa del germen patógeno. La minociclina y tal vez la doxiciclina son más lipófilas que los otros congéneres y atraviesan la bicapa lipídica directamente. El segundo proceso implica un sistema de transporte activo con gasto de energía, que bombea todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna, este transporte puede requerir un portador periplasmático proteico.

La síntesis de proteínas se inhibe de forma inmediata y total tras el tratamiento de los organismos sensibles con tetraciclinas (Gale y Folkers, 1953; Hash y cols., 1964). La cantidad unida a la subunidad ribosómica 30S es mayor que la cantidad unida a la subunidad 50S (Day, 1966; Maxwell, 1968). Se han hecho estudios usando técnicas de fluorescencia para identificar cuál de estas interacciones es la más significativa para la acción de las tetraciclinas, estimando el número de lugares de unión disponibles en los ribosomas de *E.coli* (Fey y cols., 1973). Los resultados indican que una molécula se une en una interacción fuerte con cada subunidad 50S y tres moléculas se unen a la subunidad 30S. Se ha sugerido que la unión fuerte no es la interacción inhibitoria, sino que la unión débil a la subunidad 30S es la unión que conduce al efecto antibacteriano.

Las tetraciclinas no inhiben la unión del cloranfenicol (Vazquez, 1964) o de la lincomicina (Weisblum y Davies, 1968) a los ribosomas, fármacos que es conocido que

se unen a la subunidad 50S del ribosoma, elemento que sugiere que las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S.

La unión está limitada por la presencia de iones magnesio, viéndose reducida a concentraciones bajas de éste (Bodley y Zieve, 1969), lo cual indica que en esta unión se utiliza magnesio.

I.1.4. Actividad antibacteriana.

Las tetraciclinas tienen un espectro antimicrobiano muy amplio, que incluye gran parte de bacterias Gram positivas y Gram negativas. También son efectivas contra algunos microorganismos resistentes a agentes que ejercen sus efectos sobre la pared de la célula bacteriana, como *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y algunos protozoos (Baxter y McKellar, 1995). In *vitro*, la principal acción de estos fármacos es bacteriostática, actuando sobre microorganismos en multiplicación.

En general, las bacterias Gram positivas responden a menores concentraciones de tetraciclinas que las bacterias Gram negativas (Kapusnik-uner y cols., 1996), sin embargo, este grupo de fármacos rara vez está indicado en infecciones causadas por bacterias Gram positivas debido a las resistencias que se han desarrollado y a que actualmente se dispone de opciones más selectivas para estos microorganismos.

Las tetraciclinas inhiben a *Neisseria gonorrhoeae* y a muchas cepas de *Neisseria meningitidis* (CMI₉₀= 1 a 2 µg/ml), pero se ha observado que se desarrollan rápidamente resistencias si se usa una tetraciclina como único tratamiento frente a infecciones como la gonorrea (Knapp y cols., 1987). Casi todas las cepas de enterococos son resistentes a la tetraciclina; los estreptococos del grupo B muestran sensibilidad en el 50% de los casos y sólo el 65% de *Staphylococcus aureus* siguen sensibles (Standiford, 1995). Como el cloranfenicol, todas las tetraciclinas son muy efectivas contra *Rickettsia*, responsable de la fiebre de las “Montañas Rocosas” o el tifus murino.

En relación con el grupo *Bacteroides fragilis*, las tetraciclinas son mucho menos activas que el cloranfenicol, la clindamicina, o ciertos antibióticos betalactámicos, por lo que estos agentes han remplazado a las tetraciclinas en el tratamiento de la mayoría de las infecciones anaerobias (Sanford y cols., 1989).

Las normas del *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, señalan que los microorganismos son considerados sensibles si la CMI de las tetraciclinas es igual o inferior a 1 µg/ml, medianamente sensibles si la CMI está comprendida entre 2 y 8 µg/ml, y resistentes si la CMI es superior a 8 µg/ml (tabla 1). Teniendo en cuenta este criterio, muchas especies de *Mycoplasma* son sensibles, si bien algunas cepas de *M. hyopneumoniae* y de *M. bovis* han desarrollado resistencias (Prescott y Baggot, 2000). Las infecciones causadas por bacilos (Brucelosis, Tularemia, Actinomycosis) son particularmente sensibles a estos fármacos.

Globalmente, puede considerarse que el espectro de actividad de las tetraciclinas incluye gran cantidad de bacterias como *Neisseria*, *Listeria*, *Shigella spp*, aunque se trata de microorganismos poco frecuentes. Además, las tetraciclinas en concentraciones elevadas presentan actividad antibiótica frente a los protozoos *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* y *Plasmodium falciparum*.

Tabla 1. Actividad antibacteriana in vitro de las tetraciclinas (Prescott y Baggot, 2000)

Microorganismo	CIM₅₀	CIM₉₀
Aerobias grampositivas		
<i>A. pyogenes</i>	25	64
<i>B. anthracis</i>	0.12	4
<i>C. pseudotuberculosis</i>	≤ 0.25	≤ 0.25
<i>C. renal</i>	3.1	4
<i>E. rhusiopathiae</i>	0.2	0.25
<i>L. monocytogenes</i>	0.25	1.0
<i>R. equi</i>	2.0	4
<i>S. aureus</i>	0.3	>64
<i>S. agalactiae</i>		0.25
<i>S. dysgalactiae</i>	4.0	>32
<i>S. uberis</i>	0.5	0.5
<i>Streptococos de grupo</i>	1.0	2.0
Anaerobias gram positivas		
<i>Actinomyces spp</i>	0.5	1.0
<i>C. perfringens</i>	0.1	32
<i>Clostridium spp</i>	0.1	8
Anaerobias gramnegativas		
<i>Actinobacillus spp</i>	≤ 0.25	≤ 0.25
<i>A. pleuropneumoniae</i>	0.8	≥16
<i>B. Bronchiseptica</i>	1.6	≥16
<i>B. canis</i>	0.09	0.25
<i>C. jejuni</i>	0.12	>64
<i>E. coli</i>	4.0	>64
<i>H. equigenitalis</i>	≤0.2	0.4
<i>H. somnus</i>	1.6	2
<i>K. pneumoniae</i>	2.0	>16
<i>T. hyodysenteriae</i>	0.4	50
<i>Leptospira spp</i>	1.0	4.0
<i>M. bovis</i>		0.64
<i>P. multocida</i>		
<i>Bovino</i>	0.5	>128
<i>Porcino</i>	0.4	0.4
<i>P. haemolytica</i>	1.0	>128
<i>Proteus sp</i>	>16	>16
<i>Pseudomonas</i>	>16	>16
<i>S. typhimurium</i>	>16	>16
Anaerobia gramnegativas		
<i>B. fragilis</i>	12.5	25
<i>D. nodosus</i>		0.12
<i>B. asaccharolyticus</i>	1.0	2.0
Micoplasmas		
<i>M. bovis</i>		0.4
<i>M. bovirhinis</i>	6.2	12.5
<i>M. canis</i>		12.5
<i>M. hyopneumoniae</i>	0.16	0.8
<i>M. hyorhinis</i>	0.4	0.8
<i>M. hyosynoviae</i>		33
<i>M. ovipneumoniae</i>		0.45
<i>Ureaplasma spp</i>		0.06

I.1.5. Resistencia bacteriana

Como consecuencia del amplio uso que se ha hecho de estos antibióticos, se presentan con cierta frecuencia bacterias resistentes a las tetraciclinas. Tal como se ha descrito, la penetración de las tetraciclinas en el citoplasma bacteriano se realiza mediante difusión pasiva a través de los poros de la pared bacteriana y posteriormente por mecanismos de transporte activo. Precisamente, la alteración del sistema de transporte activo provoca una disminución en la captación de las tetraciclinas por los microorganismos. Esta resistencia parece estar mediada por plásmidos y es inducible.

Se han descrito resistencias cruzadas entre los diferentes antibióticos de la familia, si bien es menor para la doxiciclina y la minociclina, gracias a que su mayor lipofilia les permite penetrar en el interior de la bacteria sin necesidad de transporte activo.

Asimismo, se han descrito otros mecanismos de resistencia como el acceso menor de las tetraciclinas al ribosoma debido a la presencia de proteínas que los protegen y por último la síntesis de enzimas inactivadoras de las tetraciclinas (Speer y cols., 1992; Schnappinger y Hillen, 1996). En general, estas resistencias son de aparición lenta.

Muchas cepas de estafilococos y estreptococos e incluso neumococos, son resistentes. Las pseudomonas y enterobacterias son resistentes. Los gonococos y neumococos que son resistentes a la penicilina suelen serlo también a las tetraciclinas (Doern y cols., 1998).

Muchas especies de micoplasmas son sensibles, aunque se ha observado que algunas cepas de *M. hyopneumoniae* y de *M. bovis* han desarrollado resistencia (Prescott y Baggot, 2000).

I.1.6. Farmacocinética

Como norma general, cuanto mayor es la liposolubilidad relativa de una tetraciclina, mayor es su tasa y velocidad de absorción, su unión a proteínas plasmáticas y más lenta su biotransformación, y como consecuencia más prolongada su semivida biológica.

Las tetraciclinas se pueden clasificar en tres subgrupos según su liposolubilidad:

- Hidrosolubles: clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC) y limeciclina presentan una absorción oral incompleta.

- Intermedias: demeclociclina y metaciclina presentan absorción no total.
- Liposolubles: doxiciclina y minociclina presentan absorción completa.

I.1.6.1. Absorción

Las tetraciclinas se absorben en el estómago y en la primera parte del intestino delgado, siendo ésta mayor y más completa en estado de ayuno. Las tetraciclinas más hidrosolubles presentan una absorción relativamente lenta (T_{\max} 2 a 4h) e incompleta (biodisponibilidad del 40 al 85%). La doxiciclina y la minociclina tienen una absorción más rápida (T_{\max} 0.5 a 1h) y completa (mayor del 95%), afectándose apenas su biodisponibilidad en presencia de alimentos (Steigbiegel y cols., 1968).

La absorción de las tetraciclinas disminuye por la ingestión simultánea de productos lácteos; geles de hidróxidos de aluminio, sales de calcio, magnesio, hierro o zinc (Ericsson y cols., 1982) y por la formación de complejos de cationes divalentes y trivalentes presentes en el medio (Aronson, 1980).

La quelación del catión por parte del antibiótico provoca la alteración de la estructura química, reduciéndose la absorción hasta niveles mínimos. Esta interacción parece afectar con menor intensidad las tetraciclinas de acción prolongada.

Es adecuada la inyección intramuscular para la oxitetraciclina y la tetraciclina, pero no para la clortetraciclina, ya que es ligeramente irritante y se absorbe poco e irregularmente desde el lugar de inyección.

Por vía intramuscular (i.m.), la oxitetraciclina y la tetraciclina se absorben bastante bien y se detectan en plasma a los 15 min, alcanzando su valor máximo en una hora. Se mantiene en márgenes terapéuticos durante 12 horas, declinando posteriormente hasta ser indetectables 24 horas después de la inyección. No obstante, esta vía de administración está muy influida por el vehículo y la formulación utilizada. Las distintas formulaciones dan lugar a velocidades de absorción distintas y por tanto a comportamientos farmacocinéticos muy variables (Davey y cols., 1985; Fourtillan y cols., 1989; Escudero y cols., 1994).

Tras la administración por vía intravenosa (i.v.), las tetraciclinas permanecen en sangre bastante más tiempo que otros antibióticos. Su dosis terapéutica permite valores

adecuados en plasma durante las 24 horas posteriores a su administración (Sumano Lopez y Ocampo Camberos, 1999).

Cuando las tetraciclinas son administradas por vía vaginal a vacas, se observa una absorción desde el útero significativamente alta que depende de diversos factores. Así, en el periodo posparto, la absorción es considerablemente más baja que después de la involución completa del útero. También disminuye significativamente en el caso de la existencia de endometritis. Esta baja absorción facilita la presencia de altas concentraciones en la cavidad uterina y en el endometrio (Roncada y cols., 2000).

La oxitetraciclina, como casi todas las tetraciclinas, se absorbe en el estómago y la porción inicial del intestino delgado, alcanzando una biodisponibilidad superior al 70%. La absorción de la oxitetraciclina disminuye cuando en el estómago existen alimentos (sobre todo cuando se trata de leche y sus derivados).

Normalmente la concentración plasmática máxima (C_{max}), tras una administración oral, se alcanza entre 1 y 3 horas.

En un estudio realizado en cerdos, a los que se administró 20 mg/kg de oxitetraciclina por vía i.m. se pudo observar que las concentraciones plasmáticas alcanzaron valores de 6.7 ± 3.4 $\mu\text{g/ml}$ a los 90 min de la inyección. En el mismo estudio, otro grupo de cerdos fue tratado con pienso dosificado con oxitetraciclina pura (0.55 mg/kg). En este grupo la concentración plasmática observada fue de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 h y disminuyó hasta 0.25 $\mu\text{g/ml}$ al final del estudio (96 h) (Hall y cols., 1989).

Estudios realizados en cabras y ovejas (Escudero y cols., 1996), compararon los parámetros farmacocinéticos tras la administración i.m. de oxitetraciclina a una dosis de 20 mg/kg, y se encontró que las concentraciones plasmáticas en cabras y ovejas eran similares, del orden de 3.4 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, los tiempos en que se alcanzaban estas concentraciones variaban de una especie a otra.

En un estudio realizado en perros sanos y otros afectados con *Ehrlichia canis*, a los que se administró una dosis de 20 mg/kg por vía i.m. de OTC de larga acción, se observó que la C_{max} fue significativamente más baja en animales enfermos que en animales sanos y el T_{max} era más corto en los animales enfermos, observándose así que

la velocidad de absorción era más lenta en los animales sanos que en los animales enfermos (Kikuyi y cols., 2001).

I.1.6.2. Distribución

Debido a las características ya descritas, las tetraciclinas se distribuyen de forma rápida y difunden bien por todos los tejidos y líquidos corporales. Se unen a las proteínas plasmáticas en un grado variable, así la doxiciclina se une a proteínas entre un 80 y un 95%, la demeclociclina entre el 65 y 90%, la metaciclina alrededor de un 80%, la minociclina alrededor de un 75%; la tetraciclina en un 65% y la oxitetraciclina entre el 20 y el 40% (Merle y cols., 1991).

Las tetraciclinas se concentran en el hígado y se excretan por la bilis, alcanzándose en ésta concentraciones de 5 a 10 veces mayores que las plasmáticas para la clortetraciclina, la oxitetraciclina y la tetraciclina, mientras que para la demeclociclina, la doxiciclina y la minociclina las concentraciones biliares son entre 10 y 30 veces superiores a las observadas en plasma. Tras la excreción biliar, las tetraciclinas sufren procesos de reabsorción más o menos intensos, sufriendo recirculación enterohepática (Barrigon y cols., 1993).

Debido a su capacidad de formar quelatos, las tetraciclinas tienen tendencia a depositarse en huesos y dientes, siendo tanto más evidente este efecto cuanto mayor sea la duración del tratamiento (Grossman y cols., 1971) y mayor la capacidad individual de cada tetraciclina para formar complejos más o menos estables.

La inflamación de las meninges no es un requisito indispensable para que las tetraciclinas puedan alcanzar el líquido cefalorraquídeo (LCR). La penetración de estos antibacterianos en otros líquidos corporales y tejidos es excelente.

Tras la administración sistémica de estos fármacos, se alcanzan concentraciones similares a las plasmáticas en el útero, tejidos uterinos y en el lumen, tanto en úteros normales como enfermos. Asimismo, ha podido observarse que existe una buena distribución en el tracto genital tubular así como en ovarios. Tras la administración i.m. de una dosis de 10 mg/kg, dos veces al día, se alcanzan en los tejidos genitales concentraciones superiores a la CMI de la mayor parte de los microorganismos

sensibles a estos fármacos y con frecuencia presentes en las infecciones genitales de los mamíferos (Bretzlaff y cols., 1982; Bretzlaff y cols., 1983).

En perros a los que se administró 10 mg/kg de tetraciclina por vía intravenosa (i.v.), pudo observarse que la distribución del antibiótico en los tejidos era muy extensa, alcanzando concentraciones altas en hígado, riñón, tejido adiposo y orina. El mismo estudio se realizó con clortetraciclina y los resultados obtenidos fueron similares a los de la tetraciclina (Barza y cols., 1975).

Se han detectado concentraciones de tetraciclina en la leche de las vacas tratadas tras la administración del fármaco por vía i.v., i.m. e intrauterina (Miller y Bergt, 1974; Anderson y cols., 1995).

La oxitetraciclina circula en el plasma fijada a proteínas en una proporción entorno del 20-60%. En perros se ha alcanzado hasta el 80% de unión a proteínas. El fármaco libre se distribuye muy bien por todo el organismo. La liposolubilidad de la oxitetraciclina determina en gran medida tanto su distribución en el organismo como la rapidez con que se elimina. Penetra en la mayor parte de los tejidos y líquidos del organismo y en menor grado accede al LCR (20-25 %). La rapidez con que atraviesa las membranas tisulares y las barreras hematoencefática y sangre-LCR, depende también de su unión a las proteínas plasmáticas (Reja y cols., 1996).

Como consecuencia de su quelación con el calcio, ésta se fija en los sitios de osificación activa y en los dientes que se hallan en fase de crecimiento.

En un estudio realizado en cabras, a las que se administró 10 mg/kg de oxitetraciclina por vía i.v., se observó un volumen de distribución (V_{dss}) de 1.2 l/kg, y una semivida biológica ($t_{1/2B}$) de 6.5 h. Tras la administración de una dosis de 20 mg/kg, el $t_{1/2B}$ aumentaba ligeramente hasta 8.5 h (Escudero y cols., 1994).

En un estudio realizado en ovejas sanas y ovejas infectadas, se observó que la OTC se distribuye rápidamente en el pulmón de los animales enfermos, alcanzando concentraciones superiores a las de pulmón de los animales sanos después de 1 hora de administración de una dosis de 10 mg/kg por vía i.v. (Baxter y McKellar, 1990).

Cuando se administró a cabras y ovejas una dosis de 5 mg/kg de oxitetraciclina por vía i.v., se observó que el V_{dss} era similar en las dos especies (2.5 l/kg) en cambio, la semivida biológica ($t_{1/2B}$) obtenida en cabras (3.9 h) era más corta que la observada en ovejas (6.3 h) (Elsheikh y cols., 1997).

Kikuvi y cols (2001), observaron en un estudio realizado en perros a los que se administró una dosis de 20 mg/kg de OTC de larga acción por vía i.m., que el V_{dss} era más alto en los animales enfermos que en los animales sanos.

I.1.6.3. Metabolismo

Las tetraciclinas se metabolizan en el hígado en diferentes proporciones y de acuerdo con el tipo de tetraciclina de que se trate. Sin embargo, en la mayor parte de los casos el compuesto detectado con más frecuencia en heces, orina y tejidos es la tetraciclina original, y el grado de biotransformación es mínimo.

I.1.6.3. Eliminación

La eliminación de las tetraciclinas se realiza fundamentalmente por excreción renal y a través de las heces. El estado de la función renal afecta de forma significativa su excreción, ya que la depuración renal de estos fármacos se realiza por filtración glomerular (Kunin, 1967).

La minociclina se recupera en orina y heces considerablemente metabolizada y en cantidades significativamente menores a otras tetraciclinas. El fármaco persiste en el organismo después de la suspensión del tratamiento, hecho que puede deberse a su retención en el tejido adiposo.

Las tetraciclinas se excretan también en la leche. El nivel alcanzado en la leche materna es la mitad del nivel que se encuentra en el plasma.

Kirkwood y cols (1990) observaron una diferencia en la semivida de eliminación entre 79 min en conejos y 942 min en caballos, diferencias que atribuyeron a las diferencias alométricas entre especies.

En un estudio realizado en perros sanos y perros afectados por *Ehrlichia canis*, a los que se administró una dosis de 20 mg/kg por vía i.m., se observó que la semivida de

eliminación aumentaba en los animales infectados (Kikuvi y cols., 2001). Este aumento podría deberse a la disminución de la velocidad de metabolismo y excreción de los fármacos en presencia de fiebre (Anika y cols., 1986; Nouws, 1986; Monshouwer y Witkamp, 2000).

La oxitetraciclina se excreta con la orina por filtración glomerular y, en menor medida, por la bilis. También se excreta por la saliva y la leche.

En general, los estudios realizados muestran diferencias significativas entre especies en el tiempo de vida media de la fase terminal de excreción de la oxitetraciclina. Tras la administración de OTC por vía i.v., algunos autores observaron una semivida de eliminación entre 6.4 y 11.8 h en terneros de 1 a 3 meses de edad (Schifferli y cols., 1982; Ames y cols., 1983; Nouws y Vree, 1983; Burrows y cols., 1987), de 9 h en vacas (Yoder y Packer, 1954; Pilloud, 1973), de 10 h en caballos (Pilloud, 1973), entre 2.8 y 3.8 h en cerdos jóvenes (Mercer y cols., 1978; Xia y cols., 1983; Mevius y cols., 1986), de 3.8 h en cabras (Elsheikh y cols., 1997) y de 6.3 h en ovejas (Elsheikh y cols., 1997). Tras su administración por vía i.m. la semivida de eliminación fue de 15 h en terneros (Ames y cols., 1983; Nouws y Vree, 1983; Banting y cols., 1985), de 11 h en vacas lecheras (Banting y cols., 1985) y de 10 h en cerdos (Banting y Baggot, 1996). Estas diferencias en la semivida de eliminación, se deben a factores como la vía de administración utilizada, al tipo de formulaciones y a la edad de los animales tratados.

En un estudio realizado en vacas, (Meijer y cols., 1993), observaron una semivida de eliminación muy prolongada, de alrededor de 96 h, tras la administración de la OTC por vía i.m. y i.v.. Estos autores concluyeron que la lenta eliminación de la OTC podía atribuirse probablemente a la liberación de OTC desde los huesos, donde se había acumulado.

La administración por vía intrauterina (i.u.) de oxitetraciclina en ganado bovino mostró valores de vida media de eliminación significativamente mayores ($t_{1/2B} = 14$ h) a los observados tras la administración por vía oral o i.v. ($t_{1/2B} = 8.5$ h) (Girardi y cols., 1990).

I.1.7. Interacciones farmacológicas

Se ha señalado que existe sinergismo entre las tetraciclinas y la tilosina frente a *Pasteurella* y es posible que este fenómeno se dé también entre las tetraciclinas y los demás macrólidos. Del mismo modo, su asociación con las polimixinas produce efectos sinérgicos, apreciándose un aumento de la captación de los antibióticos por parte de las bacterias (Bentley, 1983).

Las tetraciclinas no deben administrarse junto con penicilinas, ni cefalosporinas ya que, debido a su mecanismo de acción, las tetraciclinas pueden antagonizar el efecto de los antibióticos bactericidas especialmente de los β -lactámicos, puesto que la penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared de la célula y las tetraciclinas, que inhiben la síntesis de las proteínas, pueden enmascarar el efecto bactericida de la penicilina.

Además, las tetraciclinas forman complejos con cationes di o trivalentes, por lo que su absorción puede verse reducida si se administran conjuntamente con sales de aluminio, calcio o magnesio. Del mismo modo, la presencia de antihistamínicos H_2 puede afectar su absorción, disminuyéndola.

El uso de metoxifluorano (anestésico general) con tetraciclinas aumenta la posibilidad de nefrotoxicidad (Azanza y cols., 1997).

I.1.8. Utilización clínica

Las tetraciclinas son ampliamente utilizadas para la prevención y el tratamiento de un gran número de enfermedades infecciosas (respiratorias, renales, oculares, genitales, mamitis, etc.) producidas por gérmenes Gram positivos, Gram negativos, *Mycoplasma*, *Rickettsias*, *Clamideas*, etc. Se utilizan en porcino, bovino, ovino, aves, perros, équidos etc. y pueden administrarse con facilidad por diferentes vías (i.m., i.v. u oral, mezcladas con el pienso o con el agua de bebida).

Se han observado buenos resultados con la utilización de tetraciclinas en el tratamiento de infecciones intracelulares por *Brucella*, en infecciones urinarias causadas por *Pseudomonas*, y en infecciones urinarias y respiratorias en perros, gatos, cerdos y aves causadas por *Borrelia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Listeria* (Lewis y cols., 1973; Ling y cols., 1981; Ball y Campbell, 1989; Baxter y McKellar, 1990).

En pequeños animales, las tetraciclinas han sido utilizadas, con buenos resultados en el tratamiento de infecciones provocadas por *Rickettsia* y *Ehrlichia*. El tratamiento con 6-10 mg/kg permite la remisión de los signos clínicos asociados con la enfermedad (Davidson y cols., 1978).

Las tetraciclinas son eficaces en casos de psitacosis y en infecciones gonocócicas simples.

Asimismo, es de gran interés su utilización para el tratamiento de las infecciones bacterianas uterinas en el ámbito veterinario. Se ha podido observar como el tratamiento puede prevenir la aparición de metritis y consigue mejorar la fertilidad.

Las tetraciclinas son comúnmente usadas en la prevención y el tratamiento de la rinitis atrófica y enfermedades del tracto respiratorio inferior (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus pleuropneumoniae*) y en la prevención de la adenomatosis proliferativa. Brotes de neumonía han sido controlados mediante la administración de pienso medicado. Asimismo, piensos medicados con clortetraciclina han sido usados para el control de la adenomatosis y para erradicar la leptospira del hígado de los cerdos (Stahlheim, 1967; Love, 1977).

Pijpers y cols (1990) y Hunneman y cols (1994) estudiaron la prevención de pleuroneumonía en cerdos después de ser contagiados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Previamente al contagio, se les había suministrado pienso con dosis crecientes de oxitetraciclina (400, 800, 1200 y 1600 mg/Kg). La medicación del pienso con 400 o 800 mg de oxitetraciclina/kg de pienso previno los signos clínicos de las alteraciones producidas después de la inoculación del agente patógeno, mientras que piensos con dosis mayores del fármaco (1600 mg/kg) protegían al cien por cien de los animales tratados (Pijpers y cols., 1990; Hunneman y cols., 1994).

Cooper y cols (1993) determinaron la actividad de algunos fármacos (danofloxacina, tilosina, y OTC) *in vitro* frente a cadenas aisladas de 7 cepas de micoplasma de interés veterinario en ganado vacuno, porcino y aves de corral. En general, la OTC mostró baja actividad en la mayor parte en estas cepas de micoplasma (entre 0.008 y 16 µg/ml), y ésta superior a la que presenta la tilosina frente *Mycoplasma bovis genitalium* (Cooper y cols., 1993).

La oxitetraciclina es de las tetraciclinas más antiguas que se han utilizado durante muchos años incorporada en el pienso de los animales para el control de las enfermedades infecciosas, por su bajo precio, por su amplia actividad antimicrobiana, por su facilidad de administración y por su eficacia. Su amplio, generalizado y muchas veces indiscriminado uso ha contribuido a que hayan aparecido resistencias en bacterias patógenas de importancia clínica, siendo este el motivo de que en la actualidad su valor como antibióticos bacteriostáticos sea mucho menor. No obstante, su capacidad para alcanzar concentraciones eficaces en la mayoría de los tejidos, junto con su amplio espectro de actividad hace que la oxitetraciclina sea útil en el tratamiento de las infecciones mixtas.

Bovino. Muchos microorganismos que producen neumonía en bóvidos son sensibles a las concentraciones que la oxitetraciclina es capaz de alcanzar en el tejido pulmonar. Este fármaco suele ser útil para el tratamiento de las neumonías en los bóvidos y también de su profilaxis.

La administración i.m. de formulaciones de acción retardada a una dosis de 20 mg/kg cada 48 h de 2 a 4 veces puede ser apropiada en el tratamiento de las enfermedades respiratorias.

Se recomienda la utilización de OTC en el tratamiento de anaplasmosis causada por un parásito de los glóbulos rojos, *Anaplasma marginalis*.

También se utiliza en el tratamiento de queratoconjuntivitis causada por *Moraxella bovis* (George y cols., 1988; George, 1990b), así como para tratar mastitis en bovinos, causada por *Mycoplasma californicum*, donde se recomienda la utilización de OTC con tilosina (Ball y Campbell, 1989).

Ovino. Se utiliza OTC en el tratamiento de queratoconjuntivitis en ovino, causada por *Micoplasma conjunctivae* (Hosie, 1988; Hosie y Greig, 1995).

La administración de la OTC de larga acción fue beneficiosa para la prevención de la neumonía provocada por *Pasteurella haemolytica* en ovejas (Appleyard y Gilmour, 1990) y se ha usado con éxito en el tratamiento de infecciones en la pata de ovino (pedero de ovejas) (Grogono-Thomas, 1994) y en dermatofiosis (Jordan y Venning, 1995).

Porcino. La OTC suele emplearse tanto para prevenir como para tratar la rinitis atrófica y las enfermedades de las vías respiratorias bajas (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*).

La utilización de formulaciones de larga acción para prevenir infecciones causadas por *Actinomyces pleuropneumoniae* es más eficaz que la utilización de las formulaciones convencionales.

Perro. Es el fármaco de elección para tratar las infecciones causadas por *Ehrlichia canis* y otras infecciones causadas por *Rickettsias* (Adawa y cols., 1992).

I.1.9. Reacciones adversas

Las reacciones adversas de las tetraciclinas se pueden atribuir a su carácter extremadamente irritante, provocando vómitos tras su administración por vía oral y lesiones tisulares en el lugar donde se inyectan. Se ha observado que la OTC es irritante para los tejidos. A este respecto, se han observado notables diferencias entre distintas especialidades farmacéuticas con OTC. En general, se puede afirmar que cuanto más irritante es el preparado, menor es la biodisponibilidad del fármaco y mayor es el tiempo que permanece en el punto de inyección (Nouws y Vree, 1983).

También, las tetraciclinas modifican la flora intestinal dando lugar a diarreas y trastornos gastrointestinales. Asimismo, son capaces de quelarse al calcio provocando efectos cardiovasculares, formación de depósitos en los dientes y en los huesos y presentan una ligera acción tóxica sobre las células hepáticas y renales.

Después de utilizar cualquiera de las tetraciclinas surgen reacciones cutáneas que incluyen erupciones morbiliformes, urticaria, erupciones medicamentosas fijas y dermatitis exfoliativa generalizada. Entre las respuestas alérgicas más intensas están angioedema y anafilaxia. Otros efectos que se han atribuido a la hipersensibilidad son irritación de ojos, glositis atrófica o hipertrófica.

La dimeclociclina, doxiciclina y en menor grado otros derivados, pueden producir reacción de fotosensibilidad leves o graves de la piel en personas tratadas y expuestas a la luz solar.

En bóvidos, se ha observado que la administración de dosis elevadas de tetraciclinas (33 mg/kg por vía i.v.) causa esteatosis hepática (infiltración de grasa en el hígado) y necrosis grave de los túbulos renales proximales (Griffin, 1979; Lairmore y cols., 1984). Se han reportado, en ovinos, efectos cardiovasculares cuando la administración de tetraciclina se efectúa por vía i.v. de forma rápida.

El 20% de los preparados de acción prolongada provocan un incremento de la acción irritante del principio activo (Prescott y Baggot, 2000).

En équidos, la principal reacción adversa observada tras la administración oral de tetraciclinas es la supresión de la microflora intestinal propia del animal, favoreciéndose el crecimiento de algunas cepas de *Salmonella* resistentes a tetraciclinas o de otros patógenos, provocando la aparición de diarreas graves (Prescott y Baggot, 2000).

I.1.10. Toxicidad

En general, los efectos tóxicos observados han tenido una relación directa con dosis elevadas y con una alta frecuencia de administración

Cuando se elige la vía i.v. con administración rápida, puede aparecer el síndrome del colapso agudo, así como arritmias cardíacas graves, trastornos de la conducción e hipotensión.

El tratamiento oral prolongado con altas dosis de OTC en terneras (33 mg/kg), puede provocar una sobreinfección en el abomaso.

Se han registrado lesiones hepáticas (infiltración de grasa) y necrosis renal a nivel de los tubos proximales cuando se usan en el tratamiento de enfermedades respiratorias en bovinos de engorde (Riviere y Spoo, 1995).

Las tetraciclinas pueden agravar la uremia en animales con nefropatías mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas. También inducen el metabolismo de los aminoácidos, provocando hiperazotemia (Shils, 1963).

La oxitetraciclina y la tetraciclina son los antibióticos menos hepatotóxicos de este grupo. La mayoría de casos de toxicidad hepática se han observado en humanos que

recibían 2 g/día del fármaco por vía parenteral, aunque también se ha observado tras la administración oral de dosis elevadas.

I.1.11. Epimerización de las tetraciclinas

En 1952 Hochtein y cols, observaron que estas moléculas sufren, durante el manejo con disolventes a pH ácido, diferentes modificaciones en su estructura que provocan la formación de nuevas moléculas o productos de degradación que pueden tener efectos secundarios sobre la salud humana. La formación de los metabolitos de las tetraciclinas puede deberse a una reacción de dihidratación en el carbón C₆-OH formando anhidrotetraciclinas. Esta molécula es inestable en solución acuosa y puede provocar la formación de α y β apo tetraciclinas. También la oxitetraciclina puede sufrir epimerización en el carbón C₄ dimetilamino para formar 4-epioxitetraciclina (4-epiOTC) (ver Fig. 4).

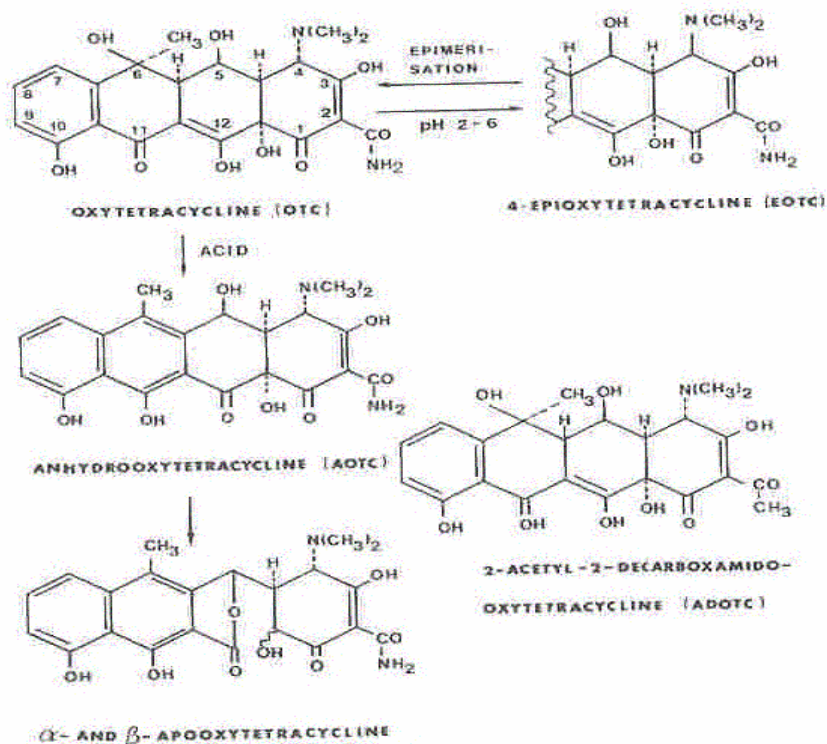


Figura 4. Epimerización de las tetraciclinas (Khan y cols., 1987).

En la literatura, hay pocos trabajos sobre métodos que permitan la separación de OTC y sus metabolitos. En 1980, Mourot y cols. desarrollaron un método para separar la OTC y su 4- epímero utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) en

fase reversa con iones divalentes y la fase móvil utilizada contenía tampón TBA y acetonitrilo. En cambio, Khan y cols. (1987) utilizaron una columna polistirene-divenil benzeno (PSDVB) y como fase móvil tampón fosfato, TBA y EDTA.

En 1988, en un estudio realizado por (Martinez y Shimoda, 1988) para separar 3 tetraciclinas diferentes (OTC, TC y CTC) observaron la presencia de un pico desconocido entre TC y CTC cuya recuperación de CTC era muy baja. Los autores relacionaron la presencia del pico con la baja recuperación y también sospecharon que el tampón Mellavaine era el causante de ella. Por ello, en 1989 Martínez y cols. realizaron otro estudio para confirmar las sospechas del estudio anterior y concluyeron que la utilización del tampón Mellavaine como extractante provocaba la epimerización de la CTC justificándose así la recuperación observada, en cambio OTC y TC no sufrían este proceso.

Oka y cols. (1984), desarrollaron diferentes métodos para determinar las tetraciclinas usando CLAE, Cromatografía en Capa Fina en Fase Reversa (CCP- FR) y Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (CCPAE). Llegaron a la conclusión que la combinación de las diferentes metodologías mejoraba la recuperación y la separación de estas moléculas.

I.1.12. Estudios de residuos

I.1.12.1. Introducción

Como ya se ha comentado anteriormente, la utilización de antibióticos con fines terapéuticos o profilácticos, tanto en medicina humana como en veterinaria, ha contribuido a mantener la salud pública. Su uso en animales destinados al consumo proporciona, de igual modo, innegables ventajas, al mejorar el bienestar animal y facilitar el control de las enfermedades.

Las especialidades farmacéuticas utilizadas para el tratamiento de las diferentes enfermedades en los animales productoras de alimentos, tienen fijado un período de espera antes de que los animales tratados con ellas puedan ser sacrificados y sus tejidos sean utilizados como alimentos para el consumo humano. De esta forma, se garantiza que el fármaco se haya eliminado y no se encuentren niveles superiores a los fijados como máximos.

Estos límites máximos de residuos (LMR) tolerables son establecidos para todos aquellos tejidos que forman parte de la dieta habitual, siempre teniendo en cuenta un consumo diario de alimentos de origen animal fijado para una persona de un peso de 60 kg. A partir de la fijación de este límite para cada tejido será posible establecer para cualquier medicamento, según su cinética de eliminación, el tiempo necesario para que cada una de las sustancias activas y sus metabolitos, presentes en el organismo del animal tratado, alcancen en los diferentes tejidos niveles sin riesgo para la salud del consumidor (tiempo de espera).

Además, la evaluación de la seguridad de los aditivos y contaminantes de los alimentos se ha basado en la determinación de un nivel sin efecto (NOEL) para cada sustancia y el establecimiento de factores de seguridad que permiten fijar una cantidad de sustancia activa que al ser ingerida diariamente por el hombre no signifique ningún riesgo para su salud.

Los LMRs son fijados por Comités de Expertos tras una evaluación rigurosa de los datos procedentes de los estudios de toxicidad realizados con cada molécula, sus metabolitos y sus productos de degradación.

I.1.12.2. Nivel sin efecto tóxico observable (NOEL)

Para conocer cual es el nivel de fármaco que no tiene efecto tóxico observable es necesario realizar toda una serie de estudios que permitan definir el perfil toxicológico de cada residuo marcador.

El NOEL corresponderá a aquella dosis más baja, que en todos los estudios realizados, no haya dado lugar a ninguna reacción adversa. Se escoge el valor inferior obtenido en la especie y test más sensible.

I.1.12.3. Ingesta diaria aceptable (IDA)

A partir del NOEL, se calcula la IDA, que es una estimación de una cantidad de sustancia, expresada en base al peso corporal, que podría ser ingerida por una persona diariamente, durante toda la vida, sin apreciable riesgo para su salud. Estrictamente hablando, esto indica un rango desde cero a un límite que sería la IDA.

I.1.12.4. Límites máximos de residuos (LMR)

Se define como la concentración máxima de residuo que puede ser aceptable en un alimento, resultado del uso de un medicamento veterinario en animales destinados al consumo humano y expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco (Reglamento CE. 2377/90).

Para calcular este límite se partirá de la IDA y de los alimentos que una persona puede consumir diariamente, con el objetivo de estimar la cantidad de sustancias/residuo marcador que puede estar presente en cada tejido objeto de consumo por una persona.

$$\text{Concentración segura} = \text{IDA (x 60 kg)} / \text{Factor consumo alimentos}$$

El factor consumo esta basado en la media de la ingesta que realiza un individuo de los diferentes tipos de alimentos. Este valor se ha fijado de acuerdo a los hábitos alimenticios de los diferentes países. Para poder establecer la distribución del consumo de alimentos, es necesario conocer el perfil cinético, en particular, el patrón de distribución del fármaco y/o metabolitos en el organismo de la especie destino. Para ello es necesario realizar estudios en los que se evalué la presencia del fármaco en los tejidos que se destinan al consumo.

Para conocer cual/cuales son los tejidos diana o sea los tejidos en los que la presencia del fármaco y/o metabolitos es susceptible de provocar reacciones adversas en el consumidor, se realizan generalmente estudios con el fármaco marcado radioactivamente (C^{14}) de forma que su trazabilidad sea completa y permita identificar la presencia de la totalidad de los productos en cada uno de los tejidos procedentes de la especie destinados al consumo.

Hay que destacar que en la distribución de las cantidades de fármaco tolerables en cada tejido diana, hay que tener en cuenta la posibilidad de que el fármaco puede llegar hasta el hombre por otras vías distintas a la de la carne. Es posible que esta misma sustancia sea administrada a vacas productoras de leche o a gallinas ponedoras y por tanto podría estar presente en la leche o en huevos. Por eso, para distribuir la IDA hay que tener en cuenta los distintos componentes del factor consumo antes de fijar el LMR.

Según el Reglamento (EEC) 2377/90 del 26 de junio de 1990, se establece un procedimiento comunitario para la fijación de los LMR para las diferentes sustancias farmacológicamente activas, publicándose con posterioridad modificaciones del mismo.

Este reglamento clasifica las diferentes sustancias con acción farmacológica en cuatro categorías o anexos generales:

Anexo I: Lista de sustancias farmacológicamente activas para las que se ha establecido un límite máximo de residuos.

Anexo II: Lista de sustancias no sujetas a un límite máximo de residuos. Se trata de sustancias utilizadas en medicina veterinaria y que no suponen un riesgo para la salud del consumidor.

Anexo III: Lista de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en medicina veterinaria y para las que se ha establecido un LMR provisional que no superará los 5 años.

Anexo IV: Lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse ningún límite máximo de residuos por tratarse de sustancias que constituyen un riesgo para la salud del consumidor. Por esta razón queda prohibido administrar sustancias que se encuentren en este anexo a animales productores de alimentos.

I.1.12.5. LMR de la Oxitetraciclina

El Comité Veterinario Europeo para productos medicinales (CVMP) ha evaluado el nivel máximo de residuos de OTC aceptable en un alimento de origen animal (EMEA, 1995). Para ello, se ha partido de la IDA, estableciendo el valor de la ingesta diaria aceptable, con un factor de seguridad de 10, en 0.003 mg/kg. Por lo tanto, para una persona de 60 kg, esta IDA implicaría una dosis de 180 µg diarios. De acuerdo con esta IDA y con la distribución del fármaco en los tejidos, se han establecido para esta molécula los LMR en las distintas especies y tejidos destinados al consumo alimenticio.

Así, la OTC es uno de los fármacos que se encuentran en el anexo I de la legislación de la CE con un LMR fijado para todas las especies productoras de alimentos, en diferentes tejidos (hígado, riñón, músculo, leche, huevos y leche) y está recogido en el

reglamento CE n° 2377/90 de la Comisión de 26 del junio de 1990, modificado por el reglamento CE n° 1570/98 de la Comisión del 22 de julio de 1998 (ver cuadro 1).

Cuadro 1.

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana
			100 µg/Kg	Músculo
	Suma de	Todas las especies	300 µg/Kg	Hígado
Oxitetraciclina	medicamento base	productoras de	600 µg/Kg	Riñón
	y su 4- epimero	alimentos	100 µg/Kg	Leche
			200 µg/Kg	Huevos
			25 µg/Kg	Miel

I.1.12.6. Tiempo de espera

A partir de los LMR para cada fármaco o sustancia activa se procede a fijar el tiempo de espera para cada especialidad farmacéutica, que es el período necesario que transcurra entre la última administración de la especialidad a un animal, en las condiciones normales de empleo, y el sacrificio de éste, para que los tejidos destinados al consumo humano no presenten ningún riesgo para la salud del consumidor o sea que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos fijados por las autoridades sanitarias.

El tiempo de espera es característico de cada especialidad farmacéutica, de cada vía de administración, de cada posología y de cada especie animal.

II- OBJETIVOS

En los últimos años, el uso veterinario de antibióticos, ha sido objeto de duras críticas y presiones legales. Esto se debe a que estos agentes podrían ser los causantes directos de la aparición de reacciones adversas en humanos y del incremento de casos de resistencia a los antibacterianos administrados en personas.

Además, la posible presencia de sustancias tóxicas en los alimentos preocupa cada vez más al consumidor, influenciado por la tendencia general hacia una dieta sana y natural. Esta garantía sanitaria exigida en los últimos años es una respuesta justificada a la utilización descontrolada de diferentes sustancias en la agricultura y en la producción animal.

Actualmente en el mercado de productos veterinarios existe una gran variedad de preparaciones de larga acción o de liberación retardada (L.A). Una de ellas contiene oxitetraciclina con diferentes tipos de excipientes. Estas formulaciones permiten reducir el número de intervenciones en los animales tratados facilitando, además, el manejo y manteniendo de las concentraciones plasmáticas por encima de la concentración mínima inhibitoria, durante un tiempo más prolongado. Como consecuencia de esta práctica, existe el riesgo de que los residuos de estos fármacos o sus metabolitos persistan durante más tiempo en el animal y en los alimentos obtenidos a partir de él, llegando a la cadena humana. También en la práctica, el uso de estas formulaciones puede comportar la presencia continuada del fármaco en el organismo pero a concentraciones subterapéuticas, lo que puede facilitar la aparición de resistencias. Por estos motivos se hace imprescindible el control estricto de las formulaciones y de su posología (dosis e intervalo entre dosis) para garantizar una terapéutica eficaz y disminuir el riesgo de la aparición de resistencias.

Además, últimamente se ha incrementado la comercialización de formulaciones prolongadas. Este aumento en el número de especialidades que pretenden ser idénticas, plantea el problema de la equivalencia entre ellas (Archimbault y cols., 1989).

Por las razones expuestas se han planteado los siguientes objetivos de este estudio:

- 1- La puesta a punto de una metodología de análisis que permita la cuantificación de la oxitetraciclina en plasma de ternera de forma precisa, exacta y con la

- adecuada sensibilidad para determinar los niveles del analito en las muestras procedentes de animales tratados con el fármaco.
- 2- Analizar la cinética de disposición de la oxitetraciclina en terneros tratados por vía i.m. con una dosis de 30 mg/kg del fármaco, formulado con dos composiciones retardadas esencialmente similares.
 - 3- Evaluar la bioequivalencia entre dos formulaciones esencialmente similares, a partir del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de las concentraciones plasmáticas encontradas de las respectivas formas farmacéuticas.
 - 4- Analizar la relación del perfil cinético de oxitetraciclina con su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de distintos microorganismos patógenos causantes de infecciones en bovinos, evaluando asimismo su eficacia como antibacteriano.
 - 5- Desarrollar un método selectivo, sensitivo y eficaz que permita la detección conjunta de la oxitetraciclina y su 4-epímero en las muestras de los diferentes tejidos diana fijados por la legislación en esta molécula para la especie bovina en el rango de concentraciones de la mitad del LMR y dos veces este valor.
 - 6- Determinar los residuos de oxitetraciclina y su 4-epímero presentes en los diferentes tejidos diana para la especie objeto de este estudio y posteriormente determinar el período de supresión necesario para asegurar que la presencia del fármaco está por debajo del LMR fijado en los tejidos destinados al consumo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA EN BOVINO

III.1.1. Estudio previo

III. 1.1.1. Formulaciones de OTC empleadas

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado dos formulaciones oleosas comerciales definidas como retardadas:

Formulación A y B: OTC 300, vial inyectable de 100 ml.

Composición por vial: 300 mg de OTC /ml

Otros componentes: 2-Pirrolidona, Polivinilpirrolidona, óxido de magnesio ligero, formaldehído sulfoxilato sódico, monoetanolamina, EDTA, agua p.i.c.s.

III. 1.1.2. Animales

Para la realización del estudio previo se utilizaron 6 terneras de raza frisona, sanas, con pesos comprendidos al inicio del estudio entre 120 y 130 kg.

Previamente al inicio del ensayo, los animales se sometieron a un período de blanqueo y de aclimatación de 15 días en la propia granja donde estaban alojados y se realizó un análisis hematológico a todos ellos para comprobar su estado de salud. Todos los animales procedían de una granja acreditada.

III. 1.1.3. Dieta

Las terneras recibieron una dieta de pienso libre de fármacos, basada de granos de cereal, oleaginosas, aceite, grasas, vitaminas, cobre, paja y agua *ad libitum*.

III. 1.1.4. Protocolo experimental

El estudio farmacocinético se realizó siguiendo un modelo cruzado (ver fig. 5).

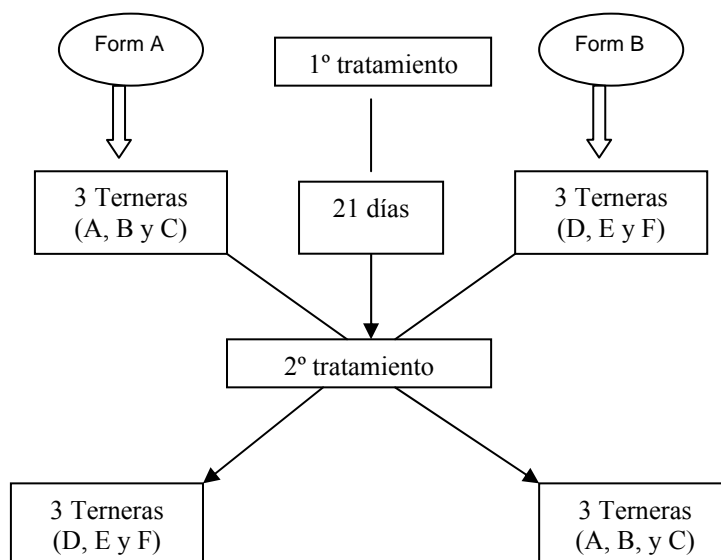
Antes de empezar el tratamiento de los animales, se les colocó una cánula en la yugular, la cual se mantuvo durante las primeras 4 horas de toma de muestras tras el tratamiento, con el fin de obtener las sucesivas muestras de sangre necesarias para realizar el estudio farmacocinético. Posteriormente, las muestras de sangre fueron tomadas directamente por punción en la vena yugular.

Tras tomar una muestra de sangre, que se utilizó como blanco de referencia, se administró a 3 animales la formulación A de OTC, a una dosis de 30 mg/kg p.v. por vía i.m. en la zona de las tablas del cuello. A los animales restantes se les administró, de la misma forma y dosis, la formulación B.

Posteriormente, se recogieron muestras de sangre a los siguientes tiempos postadministración: 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min, 5, 6, 7, 8, 10, 24, 48, 72 h y a los 4, 5, 6 y 9 días. De las muestras de sangre se obtuvo el plasma, por centrifugación, para su posterior análisis.

Pasados 21 días de la administración del fármaco, a los animales que fueron tratados con la formulación A se les administró la formulación B y viceversa, a los tratados con la formulación B se les inyectó la formulación A, a la misma dosis y vía que en el primer tratamiento. Las muestras de sangre tomadas de los animales se obtuvieron de la misma forma descrita anteriormente.

Figura 5. Esquema del tratamiento según un modelo cruzado



III. 1.1.5. Análisis de las concentraciones de OTC en muestras de plasma bovino

El análisis de las muestras de plasma obtenidas de los animales tratados se llevó a cabo según un método previamente validado (ver anexo I).

III. 1.1.6. Cuantificación de las concentraciones de OTC en el plasma de animales tratados

Las muestras analizadas fueron procesadas paralelamente con muestras blancas que contenían concentraciones conocidas de OTC a partir de las cuales se calculó la recta de regresión. Las muestras problema fueron interpoladas a la recta de calibrado obtenida para el plasma y analizada en el mismo día de análisis que las muestras problema. De esta forma se calculó exactamente la concentración de OTC presente en cada una de las muestras procedentes de los animales tratados (como se ha descrito en el apartado VIII.3.1.8, anexo I).

III. 1.1.7. Tratamiento cinético no compartimental

El estudio de los parámetros farmacocinéticos se realizó mediante un análisis no compartimental basado en momentos estadísticos. Para ello se utilizó el programa informático PK Solutions (Farrier, 1997). Se calcularon los siguientes parámetros:

C_{max}:	Concentración máxima
T_{max}:	Tiempo en que se alcanza la concentración máxima
AUC:	Área bajo la curva de niveles plasmáticos
MRT:	Tiempo medio de residencia
t_{1/2β}:	Semivida biológica en la fase terminal

Para este análisis, se han representado las curvas de niveles plasmáticos respecto al tiempo para cada uno de los animales objeto de este estudio y para cada una de las formulaciones administradas.

El análisis no compartimental permite a partir de los datos experimentales de concentración/tiempo estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlo a un modelo determinado.

Para ello se define el momento de orden cero que corresponde al área bajo la curva (AUC). Esto se puede calcular por el método de los trapecoides a partir de la curva de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo.

$$AUC_0^t = \sum_0^t \frac{C_{n-1} + C_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

El momento de 1^{er} orden, es el tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo (MRT), que se define como el tiempo en que este permanece en su forma inalterada en el organismo.

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

Donde el AUMC es el área bajo la curva del producto de las concentraciones plasmáticas por el tiempo, respecto al tiempo postadministración.

El cálculo de la semivida biológica de la fase terminal de la curva de niveles plasmáticos ($t_{1/2\beta}$) se calculó mediante un análisis de regresión lineal de la fase terminal de la curva, obteniéndose así la constante β de disposición de la fase terminal.

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

Los valores C_{\max} y T_{\max} correspondientes a los valores experimentales equivalen a los datos observados, correspondientes al tiempo de toma de muestra en que el fármaco se encuentra a niveles más elevados.

III.1.2. Estudio del perfil cinético de oxitetraciclina administrada por vía intramuscular en terneras

Como mostró el estudio previo, la oxitetraciclina usada en este estudio es una formulación retardada cuya pauta de tratamiento es unidosis y de absorción retardada, razón por la cual el periodo de blanqueo entre las diferentes adiministraciones para

realizar un estudio cruzado debería ser tan largo que afectaría considerablemente al peso de los animales. Además, éstos podrían tener también un comportamiento metabólico diferente dada la edad a la que se realiza el ensayo con los animales, pudiendo ello influir en los resultados del estudio planteado como cruzado. Para evitar una disminución en la fiabilidad de los resultados debido al aumento de la variabilidad en algunos parámetros se planteó un estudio en paralelo.

III. 1.2.1. Formulaciones de OTC empleadas

Las formulaciones utilizadas en este estudio son las mismas que se utilizaron en el estudio previo.

III. 1.2.2. Animales

Para realizar este estudio se utilizaron 28 terneras de raza frisona, hembras, sanas, de una edad entre 4 y 5 meses y con pesos comprendidos al inicio del estudio entre 130 y 135 kg.

Previamente al inicio del estudio, los animales se sometieron a un período de blanqueo y de aclimatación de 15 días en la propia granja donde estaban alojados y se realizó un análisis hematológico a todos ellos para comprobar su adecuado estado de salud. Todos los animales procedían de una granja acreditada.

III. 1.2.3. Dieta

Las terneras recibieron una dieta de pienso libre de fármacos, basada de granos de cereal, oleaginosas, aceite, grasas, vitaminas, cobre, paja y agua *ad libitum*.

III. 1.2.4. Protocolo experimental

El estudio farmacocinético se realizó siguiendo un modelo en paralelo.

Antes de empezar el tratamiento de los animales, se les colocó una cánula en la vena yugular con el fin de obtener las sucesivas muestras de sangre durante las primeras 4 horas de toma de muestras y posteriormente éstas fueron tomadas directamente por punción en la vena yugular.

Los animales se asignaron a 2 grupos de tratamiento. Se administró a 14 animales (grupo 1) la formulación A de OTC, a una dosis única de 30 mg/kg por vía i.m. en la zona de las tablas del cuello. En paralelo, a los 14 animales restantes se les administró, de la misma forma y dosis, la formulación B.

Posteriormente, se recogieron muestras de sangre a los siguientes tiempos postadministración: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 60, 72 h y a los 5, 6, 8, 9 y 10 días.

Previamente a la administración del fármaco, se tomaron muestras de sangre de los diferentes animales, las cuales se utilizaron como blancos de referencia.

III. 1.2.5. Análisis cromatográfico de las concentraciones de OTC en el plasma

El análisis de las muestras se llevó a cabo según un método previamente validado (ver anexo I).

III. 1.2.6. Cuantificación de las concentraciones de OTC en plasma de ternera

Las muestras analizadas fueron procesadas paralelamente con muestras blancas que contenían concentraciones conocidas de OTC a partir de las cuales se calculó la recta de regresión. Las muestras problemas fueron interpoladas a la recta de calibrado obtenida para el plasma y analizada en el mismo día de análisis que las muestras problemas. De esta forma se calculó exactamente la concentración de OTC presente en cada una de las muestras procedentes de los animales tratados (como se ha descrito en el apartado VIII.3.1.8, anexo I)

III. 1.2.7. Tratamiento cinético no compartimental

Ver apartado (III.1.1.7).

III. 1.2.8. Ensayo de bioequivalencia

III. 1.2.8.1. Definición

De acuerdo con la Directivas Europea, dos medicamentos son bioequivalentes si su biodisponibilidad (en velocidad y magnitud) tras su administración a la misma dosis molar del principio activo, es análoga, hasta tal punto que pueda suponerse que su eficacia y seguridad serán esencialmente idénticas (Obach y Peraire, 1998).

Cabe distinguir dos tipos de diseños para hacer un estudio de bioequivalencia:

- **Diseños en paralelo:** es un estudio randomizado completo, en el que cada individuo recibe exclusivamente una única formulación y la asignación del tratamiento se ha realizado de forma aleatoria. Este diseño en ocasiones no es el más apropiado para los estudios de bioequivalencia, puesto que la variabilidad en las observaciones comporta la variabilidad intraindividual como interindividual.
- **Diseños cruzados:** es una modificación de un diseño randomizado en bloques, de forma que cada bloque recibe más de una formulación a distintos períodos de tiempo. Un bloque puede ser un individuo o un grupo de individuos. Los individuos de cada bloque reciben una secuencia de administraciones determinadas. El diseño cruzado se denomina completo si cada secuencia contiene cada una de las formulaciones a comparar. En los estudios de bioequivalencia, siempre que sea posible, el diseño cruzado es el recomendado.

III. 1.2.8.2. Parámetros farmacocinéticos a comparar

Las directrices, tanto de la FDA como de la Unión Europea (UE), consideran los parámetros AUC y C_{max} como los más representativos. La directriz de la UE añade el T_{max} a estos dos parámetros.

La UE propone que se sometan también a comparación otros parámetros de disposición como es el tiempo medio de residencia (MRT) y la semivida correspondiente a la fase terminal de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de cada una de las administraciones objeto de este estudio.

III. 1.2.8.3. Tratamiento estadístico en los ensayos de bioequivalencia

Para realizar el análisis de bioequivalencia entre las formulaciones estudiadas se aplica un ANOVA (análisis de la varianza) como análisis estadístico previo a un ensayo de toma de decisión para los parámetros AUC y C_{max} . Si estos parámetros no cumplen una distribución normal, previo al análisis de la varianza se logotransforman los valores de AUC y C_{max} .

Para el T_{\max} se realiza un análisis no paramétrico (Test de Steinijs y Diletti's). El valor de la varianza residual se usa para calcular el intervalo de confianza del 90 % de la relación existente entre los valores promedio de la variable considerada de la formulación problema y la de referencia.

El cálculo de los intervalos de confianza se realiza mediante la expresión:

$$\text{Ln}(\mu_T) - \text{Ln}(\mu_R) = Y_T - Y_R \pm t_{(1-\alpha),v} S\sqrt{2/N}$$

Donde, las medias (Y) se calculan a partir de los correspondientes valores logarítmicamente transformados, N es el número total de sujetos, S es la estimación de la varianza dada por el ANOVA, v son los grados de libertad asociados, α es el nivel de significación del test y t es el valor correspondiente de las tablas de la t de Student.

III. 1.2.8.4. Criterios oficiales para la toma de decisión de bioequivalencia.

Según la *guía* EMEA/CVMP/016/00, los intervalos de confianza que se deben usar para la interpretación de los resultados son:

Para la **AUC**: la determinación del intervalo de confianza del 90% debe estar dentro del rango del 80% y 120%.

Para la **C_{max}**: los límites generalmente aceptables para el intervalo de confianza del 90% están entre el 80% y el 125%. Sin embargo, este parámetro puede exhibir una variación importante, y pueden ser fuertemente dependientes del esquema de muestreo por lo que los límites entre el 70% y el 143% podrían ser aceptables.

Para el **T_{max}**: como el T_{\max} es una variable discontinua que depende de los puntos de extracción prefijados, no es adecuado realizar un análisis paramétrico para su evaluación, sino que se suele calcular el intervalo de confianza por métodos no paramétricos (Hauschke y cols., 1990).

Según la *guía*, una variación de $\pm 20\%$ para un T_{\max} de 10 min no tiene el mismo significado que una variación de $\pm 20\%$ para un T_{\max} de 120 min. Por eso, el intervalo de bioequivalencia para este parámetro debe definirse cuidadosamente y debe justificarse.

Para que dos productos sean bioequivalentes se requiere que el intervalo de confianza del 90% para la diferencia entre las medias de las dos formulaciones (AUC y C_{max}) no exceda de $\pm 20\%$.

Para el T_{max} , $t_{1/2\beta}$ y el MRT no se recomienda la transformación logarítmica.

III.1.3. Evaluación de la eficacia terapéutica

Para el estudio de la eficacia terapéutica de la OTC frente a los diferentes microorganismos causantes de las enfermedades más importantes en las especies bovino y porcino y para las cuales se recomienda su uso, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de las CMI (90 ó 50, según los casos) existentes de aquellos microorganismos implicados en las principales patologías donde la OTC está recomendada. Estos datos se recogieron para su análisis matemático, de forma que se pudiera calcular el índice de eficacia utilizado en medicina humana y veterinaria y así valorar la eficacia de los fármacos utilizados frente a unas determinadas infecciones.

Según Gunderson y cols (2001) y Sánchez y cols (2000), el índice de eficacia más utilizado y los valores que se deben tener en cuenta para considerar un fármaco como efectivo son:

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

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

$$T_c > CMI (\%) = 50$$

Craig y cols (2003) consideran que el valor AUC_{0-24h}/CMI puede estar entre 25-30 según el estado inmunitario de los animales tratados.

$$AUC_{0-24h}/CMI = 25-30$$

III.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC EN BOVINO

III.2.1. Formulaciones de OTC empleadas

El estudio de residuos de OTC en bovino se llevó a cabo utilizando la formulación A.

III.2.2. Animales

Los animales fueron sometidos a un periodo de blanqueo y aclimatación de 15 días antes de iniciar el tratamiento para asegurar que los animales estaban libres de cualquier otra medicación que pudiese interferir con el fármaco objeto de este estudio.

Para la realización del estudio se utilizaron 12 terneras, sanas, de raza frisona y de pesos entre 125-130 kg al inicio de la prueba, procedentes de una granja acreditada. Las terneras permanecieron en la granja en la que se encontraban durante el tiempo que duró el estudio.

III.2.3. Dieta

Las terneras recibieron una dieta de pienso, libre de fármacos y sustancias promotoras del crecimiento basada, de granos de cereal, oleaginosas, aceite, grasas, vitaminas, cobre, paja y agua *ad libitum*.

Antes de iniciar el estudio se realizó una exploración clínica y hemogramas de los animales para comprobar que éstos se encontraban en perfecto estado de salud.

III.2.4. Tratamiento y sacrificio

Se administró a todos los animales la formulación A por vía i.m. a nivel de las tablas de cuello, a una dosis de 30 mg de OTC/kg p.v. en dosis única. La administración se realizó de forma lenta y continuada.

Después del tratamiento, se realizó un control del estado general de los animales, así como de la zona de inyección para comprobar si aparecía algún síntoma derivado de la administración de la especialidad.

Las terneras fueron sacrificadas en tres lotes de 4 animales cada uno a los 28, 35 y 42 días de la administración del producto.

De los animales sacrificados se tomaron muestras de los siguientes tejidos:

- Músculo (zona del lomo, aproximadamente 500 g).
- Punto de inyección (a partir del punto donde se realizó la inyección se tomó una circunferencia de un radio de aproximadamente 10 cm) y una profundidad de unos 5 cm equivalente a 500 – 700 g.
- Hígado (250-500 g en función del tamaño del órgano).
- Riñón (la mitad de cada uno de ellos).

Las muestras recogidas fueron homogeneizadas y se colocaron en recipientes de polipropileno de 50 ml para proceder a su almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

III.2.5. Análisis cromatográfico de las concentración de OTC + 4-epiOTC en tejidos diana de bovino

Las muestras se analizaron según un método previamente validado (ver anexo I).

III.2.6. Preparación del tejido y extracción de la OTC + 4-epiOTC

(Ver anexo I, VIII.3.3.8).

III.2.7. Cuantificación de las concentraciones tisulares de OTC + 4-epiOTC en los animales tratados

Todas las muestras problema fueron procesadas paralelamente con muestras blancas que contenían una concentración conocida de OTC + 4-epiOTC a partir de las cuales se calculó la recta de regresión. Las muestras problema fueron interpoladas a partir de la recta de calibrado obtenida para cada matriz biológica, analizada en el mismo día de análisis que las muestras problema. De esta forma se calculó exactamente la concentración de OTC + 4-epiOTC presente en cada una de las muestras procedentes de los animales tratados (ver anexo I, VIII.3.3.8).

III.2.8. Cálculo del tiempo de espera

El cálculo del tiempo de espera se realiza aplicando un cálculo estadístico basado en los principios farmacocinéticos, los cuales consideran que en el momento de la toma de las muestras, el fármaco se encuentra en una fase de eliminación lineal en qué la curva

de niveles tisulares respecto al tiempo, expresada de forma logarítmica, sigue una recta con una pendiente más o menos elevada según la velocidad de eliminación del fármaco desde cada uno de los tejidos diana. En ocasiones, los datos obtenidos no permiten el uso de este modelo cuando la mayoría de valores se encuentran por debajo del límite de cuantificación. En ese caso, el *Comitee for Veterinary Medicinal Products*, CVMP de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos, EMEA recomienda una aproximación para estimar el tiempo de espera (EMEA/CVMP/036/95 FINAL, 1996) que consiste en tomar el tiempo en que todos los tejidos tienen concentraciones por debajo del LMR y aplicarle un margen de seguridad entre el 10 % y el 30 %.

IV. Resultados

IV.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR EN TERNERAS

IV.1.1. Estudio previo del perfil cinético de oxitetraciclina administrada por vía i.m. en terneras

IV.1.1.1. Concentraciones plasmáticas

Tras el estudio previo realizado sobre 6 terneras, a las que se administró por vía i.m. una dosis de 30 mg/kg p.v. de OTC en las formulaciones A y B, las concentraciones plasmáticas de OTC obtenidas en cada tiempo de muestreo y para cada una de las formulaciones administradas durante el estudio, se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Concentraciones de OTC en terneras tratadas con una dosis de 30 mg/kg p.v. de la formulación A.

Tiempo (h)	Concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina ($\mu\text{g/ml}$)					
	Animal					
	A	B	C	D	F	F
0.16	1.5	3.5	3.1	2.7	4.7	1.6
0.33	2.0	5.0	5.0	5.4	5.8	4.9
0.50	2.7	6.3	6.7	4.9	4.8	2.3
0.75	2.6	11.2	5.9	11.2	6.3	5.9
1	2.9	11.3	9.3	8.2	5.9	7.8
1.5	4.0	6.2	6.7	6.5	5.9	8.6
2	6.5	8.5	5.9	7.2	7.1	7.6
2.5	8.0	10.7	5.7	5.5	6.6	5.1
3	7.2	8.1	10.8	4.2	6.3	7.6
4	6.0	10.5	11.6	3.2	4.9	4.0
5	7.3	12.1	9.4	2.2	5.5	5.1
6	6.3	11.1	10.0	9.0	6.7	6.4
8	4.5	11.4	8.3	5.9	5.8	5.6
10	-	10.6	5.8	4.9	5.5	4.8
24	2.3	4.6	2.6	2.6	1.9	0.9
48	1.0	1.0	1.2	0.9	0.8	0.8
72	0.2	0.9	0.9	1.0	0.5	0.5

- Muestras no recogidas

Tabla 2. Concentraciones de OTC en terneras tratadas con una dosis de 30 mg/kg p.v. de la formulación B.

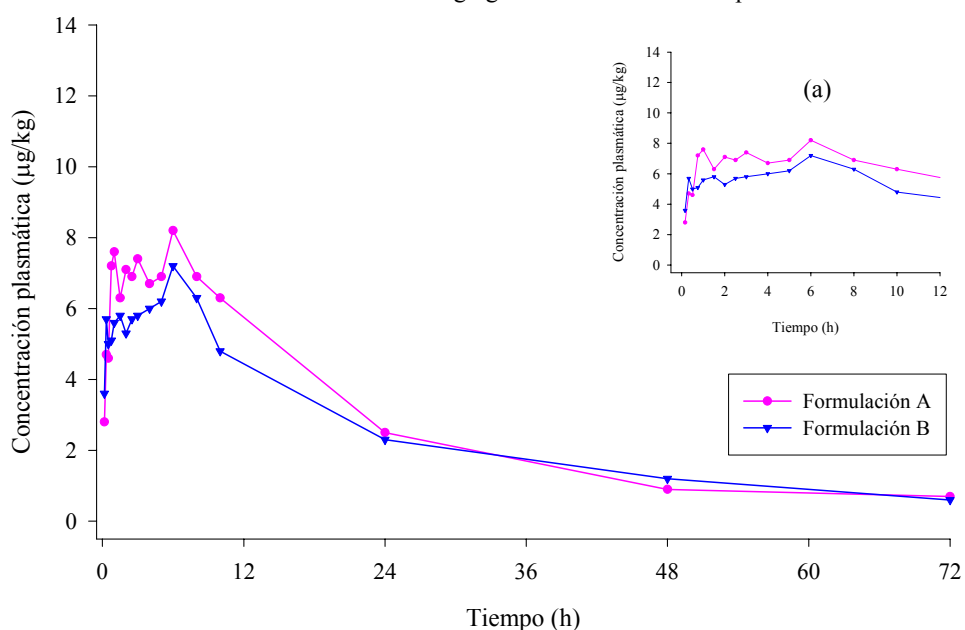
<i>Tiempo (h)</i>	<i>Concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina (µg/ml)</i>					
	Animal					
	A	B	C	D	E	F
0.16	1.5	3.5	1.7	9.7	3.2	1.9
0.33	1.3	6.1	2.2	18.0	4.4	2.4
0.50	2.5	7.9	3.1	9.3	5.6	1.9
0.75	3.2	7.7	4.8	5.5	6.3	3.1
1	2.8	7.9	5.9	6.5	6.3	3.9
1.5	2.0	7.2	5.5	8.2	7.0	4.7
2	2.0	6.6	5.9	5.6	7.2	4.6
2.5	1.8	8.7	6.4	7.6	5.8	3.8
3	3.4	9.7	4.4	8.6	5.8	2.9
4	3.3	10.2	3.9	4.6	8.5	5.4
5	4.6	8.2	6.1	5.8	6.5	5.8
6	6.3	8.6	10.5	5.7	6.1	6.0
8	5.2	7.6	7.6	6.2	6.0	5.6
10	2.4	6.6	5.0	4.1	5.1	5.5
24	2.4	3.6	1.7	1.5	2.3	2.3
48	1.5	1.6	1.4	0.7	1.0	1.1
72	0.9	0.9	0.3	0.5	0.7	0.6

En la tabla 3, se muestran las medias de las concentraciones plasmáticas obtenidas en diferentes tiempos de muestreo, de las dos especialidades administradas a las terneras.

Tabla 3. Concentraciones medias de OTC tras administrar las formulaciones A y B a terneras a una dosis de 30 mg/kg p.v.

Tiempo (h)	Media \pm DE	
	Formulación A	Formulación B
0.16	2.8 \pm 1.2	3.6 \pm 3.1
0.33	4.7 \pm 1.3	5.7 \pm 6.2
0.5	4.6 \pm 1.8	5.0 \pm 3.1
0.75	7.2 \pm 3.4	5.1 \pm 1.8
1	7.6 \pm 2.3	5.6 \pm 1.9
1.5	6.3 \pm 1.5	5.8 \pm 2.2
2	7.1 \pm 0.9	5.3 \pm 1.8
2.5	6.9 \pm 2.0	5.7 \pm 2.5
3	7.4 \pm 2.2	5.8 \pm 2.8
4	6.7 \pm 3.5	6.0 \pm 2.7
5	6.9 \pm 3.5	6.2 \pm 1.2
6	8.2 \pm 2.0	7.2 \pm 1.9
8	6.9 \pm 2.5	6.3 \pm 1.0
10	6.3 \pm 2.4	4.8 \pm 1.4
24	2.5 \pm 1.2	2.3 \pm 0.7
48	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3
72	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2

En la figura 1, se han representado las curvas correspondientes a la media de las concentraciones plasmáticas de los animales y para las dos formulaciones objeto de este estudio. Se pueden observar en la gráfica (a) las curvas correspondientes a la media de las concentraciones plasmáticas de los 6 animales durante las primeras 12 horas postadministración.

Figura 1. Curvas medias de concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina respecto al tiempo obtenidas tras la administración de 30 mg/kg del fármaco a terneras por vía i.m..

En los resultados expuestos en las tablas 1, 2 y 3 se observa que a las 0.16 h de administrar ambas formulaciones, ya se alcanzan concentraciones de OTC en el plasma, siendo éstas de $2.8 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ y $3.6 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$ para las formulaciones A y B, respectivamente. A partir de este momento, las concentraciones del fármaco siguen aumentando de forma progresiva hasta alcanzar la C_{max} alrededor de las 6 horas postadministración, en ambas formulaciones.

Al evaluar las concentraciones plasmáticas encontradas a lo largo del tiempo de muestreo, se puede ver que éstas se mantienen similares entre 0.75 y 10 horas postadministración.

Transcurridas 24 horas de la administración de las dos formulaciones, las concentraciones plasmáticas disminuyeron muy lentamente, detectándose niveles plasmáticos cuantificables a los 3 días de haber administrado ambas especialidades y siendo éstos del orden de 0.6 - 0.7 $\mu\text{g/ml}$.

En la figura 1 se puede observar de forma más clara este comportamiento, presentando ambas formulaciones un perfil similar, aunque los niveles plasmáticos encontrados de la formulación B son ligeramente inferiores a los de la formulación A durante las primeras 24 horas postadministración. A partir de este momento, los perfiles observados para ambas formulaciones prácticamente se superponen.

IV.1.1.2. Estudio farmacocinético

En las tablas 4 y 5, se muestran los parámetros farmacocinéticos, resultado del análisis de las curvas de niveles plasmáticos, para cada una de las terneras, así como los valores medios, para cada una de las dos formulaciones administradas.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de OTC obtenidos tras el tratamiento de las terneras con la formulación A a una dosis de 30 mg/kg p.v. por vía i.m.

Parámetros Farmacocinéticos	Ternera A	Ternera B	Ternera C	Ternera D	Ternera E	Ternera F
C_{max} (µg/ml)	8	12.1	11.6	11.2	7.1	8.6
T_{max} (h)	2.5	5	4	0.8	2	1.5
$AUC_0^{3\text{días}}$ (µg.h/ml)	153.2	297.6	213	174	157.2	133
AUC_0^{∞} (µg.h/ml)	157,1	319.3	253,7	224	169.6	158,5
$MRT_0^{3\text{días}}$ (h)	20,8	23.1	35.3	44	24	35
$t_{1/2\beta}$ (h)	13.6	16.7	31.4	35	21.3	35.4

C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $AUC_0^{3\text{días}}$: área bajo la curva hasta 3 días; MRT : tiempo medio de residencia; $t_{1/2\beta}$: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de OTC obtenidos tras el tratamiento de las terneras con la formulación B a una dosis de 30 mg/kg p.v. por vía i.m.

Parámetros Farmacocinéticos	Ternera A	Ternera B	Ternera C	Ternera D	Ternera E	Ternera F
C_{max} (µg/ml)	6.3	10.2	10.5	18	8.5	6
T_{max} (h)	6	4	6	0.3	4	6
$AUC_0^{3\text{días}}$ (µg.h/ml)	147.6	243.6	167.4	143	174	164.8
AUC_0^{∞} (µg.h/ml)	189.0	281.1	172	165	202	182.2
$MRT_0^{3\text{días}}$ (h)	47.5	33.4	21.8	30.5	32.9	28.8
$t_{1/2\beta}$ (h)	32.5	29	10.8	30.3	28	20.1

C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $AUC_0^{3\text{días}}$: área bajo la curva hasta 3 días; MRT : tiempo medio de residencia; $t_{1/2\beta}$: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación.

En la tabla 6, se muestra la media de los diferentes parámetros farmacocinéticos para las dos formulaciones administradas a terneras a una dosis de 30 mg/kg por vía i.m.

Tabla 6. Media de los parámetros farmacocinéticos de OTC obtenida tras el tratamiento de las terneras con la formulaciones A y B, a una dosis de 30 mg/kg p.v. por vía i.m.

Parámetros Farmacocinéticos	Media ± DE	
	Formulación A	Formulación B
C_{max} (µg/ml)	9.8 ± 2.1	9.9 ± 4.4
T_{max} (h)	2.6 ± 1.6	4.4 ± 2.2
$AUC_0^{3\text{días}}$ (µg.h/ml)	188 ± 60	173.4 ± 36.4
AUC_0^{∞} (µg.h/ml)	213.7 ± 64.8	198.5 ± 42.5
$MRT_0^{3\text{días}}$ (h)	30.4 ± 9.1	32.4 ± 8.5
$t_{1/2\beta}$ (h)	25.5 ± 9.6	25.1 ± 8.2

C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $AUC_0^{3\text{días}}$: área bajo la curva hasta 3 días; MRT : tiempo medio de residencia; $t_{1/2\beta}$: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación.

Como se puede observar en los resultados expuestos en las tablas 4, 5 y 6, de los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de las concentraciones plasmáticas de OTC en terneras, la media de la C_{max} de los diferentes animales es similar en ambas formulaciones, siendo el valor de $9.8 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ para la formulación A y $9.9 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$ para la formulación B, observándose un T_{max} para la formulación B superior al de la formulación A.

Tanto el $AUC_0^{3\text{días}}$ como el AUC_0^{∞} obtenidos son muy similares para ambas especialidades. El MRT y el $t_{1/2\beta}$ son también muy similares.

IV.1.2. Estudio del perfil cinético de oxitetraciclina administrada por vía i.m. en terneras

IV.1.2.1. Concentraciones plasmáticas

En las tablas 7 y 8 pueden observarse las concentraciones plasmáticas de OTC obtenidas en cada tiempo de muestreo hasta 10 días postadministración, tras la administración i.m. de 30 mg/kg p.v. del antibiótico en las formulaciones A y B, respectivamente.

Tabla 7. Concentraciones de oxitetraciclina ($\mu\text{g/ml}$) en terneras después de la administración i.m. de una dosis de 30 mg/kg p.v. en la formulación A

Tiempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Animal 10	Animal 17	Animal 18	Animal 19	Animal 20	Animal 21	Animal 22
1	5.1	6.2	5.8	12.4	5.1	3.6	-	2.1	5.7	3.7	9.6	13.0	6.9	6.5
2	6.7	12.0	7.2	9.3	8.0	18.0	11.5	4.6	7.2	5.2	16.9	13.9	6.1	5.6
3	5.9	7.7	7.0	8.2	5.3	5.0	9.5	4.0	7.4	5.6	7.8	8.4	6.6	6.3
4	5.9	9.8	8.6	6.4	7.6	15.4	10.4	4.7	8.1	6.0	9.5	12.1	6.7	6.4
6	5.2	5.9	7.2	8.1	5.0	5.3	9.2	4.4	7.3	5.8	6.4	10.1	3.9	5.4
8	5.0	8.8	7.3	5.5	4.6	8.5	9.2	4.3	7.4	4.8	11.6	8.6	5.3	8.0
10	4.3	4.8	6.6	5.4	5.3	5.2	8.9	4.4	5.5	4.6	5.0	8.6	5.7	5.8
12	5.0	4.4	6.3	2.8	4.8	5.0	8.7	1.5	5.4	3.5	5.0	7.9	3.8	5.1
24	2.0	1.5	2.6	1.3	2.3	1.6	3.3	1.1	2.7	2.4	3.2	-	3.3	3.7
36	1.2	1.3	1.3	0.9	1.3	1.3	2.4	1.0	1.5	1.3	1.5	1.0	1.8	1.3
48	1.1	1.9	1.1	0.8	1.7	1.1	1.5	0.9	1.0	1.0	1.2	1.3	1.0	-
60	0.9	0.9	0.9	0.3	1.3	1.0	1.1	0.8	0.8	1.3	1.0	0.1	0.8	0.9
72	0.5	0.7	0.7	0.2	1.0	0.6	0.9	0.7	0.8	1.0	0.8	0.2	0.6	0.7
120	0.3	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	0.6	0.6	0.3	0.6	0.6	0.6	0.2	0.5
144	0.2	0.6	0.5	0.2	0.5	0.5	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5	0.3	0.5	0.5
168	0.2	0.6	0.2	0.0	0.5	0.5	0.6	0.6	0.3	0.6	0.4	0.3	0.3	0.6
192	0.1	0.4	0.4	0.1	0.6	0.4	0.9	0.6	0.1	0.5	0.4	0.2	0.2	0.3
216	0.2	0.5	0.4	NQ	0.1	0.4	0.6	0.5	0.2	0.6	0.4	0.3	0.3	0.4
240	0.2	0.6	0.4	NQ	0.1	0.4	0.4	0.5	NQ	0.5	0.3	0.2	0.2	0.4

NQ: niveles por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8. Concentraciones de oxitetraciclina ($\mu\text{g/ml}$) en terneras después de la administración i.m. de una dosis de 30 mg/kg p.v. en la formulación B

Tiempo (h)	Animal 8	Animal 9	Animal 11	Animal 12	Animal 13	Animal 14	Animal 15	Animal 16	Animal 23	Animal 24	Animal 25	Animal 26	Animal 27	Animal 28
1	3.2	5.7	6.0	4.9	3.2	4.9	6.5	5.2	6.9	6.5	5.0	5.1	-	8.2
2	5.5	7.4	20.6	7.4	10.1	6.2	6.4	5.2	7.5	11.4	6.8	4.9	11.7	13.1
3	4.9	7.7	3.5	4.5	4.3	5.2	5.6	4.9	5.3	6.4	5.8	5.7	6.7	7.3
4	5.4	7.0	7.8	6.4	6.0	5.9	5.6	5.8	5.6	10.6	6.9	5.7	16.5	9.6
6	6.1	5.9	6.3	6.0	4.6	6.8	5.4	5.5	5.4	7.2	6.4	5.7	11.4	5.9
8	7.1	6.9	5.3	4.9	5.2	5.8	4.2	4.0	5.1	10.5	5.7	5.4	9.6	5.8
10	4.6	5.9	6.0	6.7	4.5	5.9	4.8	1.9	2.5	6.4	6.0	4.4	5.6	4.0
12	3.8	7.2	6.7	7.2	4.9	5.7	3.6	3.8	2.4	5.2	5.0	4.0	5.9	4.5
24	1.4	1.7	2.4	2.4	1.7	1.2	1.6	2.7	1.8	3.5	3.4	2.1	2.9	3.4
36	1.1	1.7	1.6	1.5	1.1	0.3	1.3	1.7	1.0	1.5	1.7	1.0	1.2	1.5
48	0.7	1.1	1.2	0.7	0.9	0.4	0.7	0.8	0.7	0.6	1.1	1.1	1.3	0.6
60	0.6	1.0	0.9	0.8	0.8	0.4	0.4	0.7	0.6	0.5	0.9	1.9	1.3	0.7
72	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.5	0.5	0.6	0.5	0.4	0.7	0.5	0.8	0.5
120	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4	0.2	0.3	0.2	0.6	0.4	0.4	1.3	0.3
144	0.4	0.5	0.3	0.6	0.4	0.5	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	1.7	0.2
168	0.3	0.5	0.3	0.2	0.4	0.4	0.2	0.3	0.2	-	0.3	0.2	-	0.3
192	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.6	0.2	0.6	0.1	0.2	0.3	0.4	0.7	0.3
216	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.1	-	0.1	0.2	0.3	0.5	0.4	0.2
240	0.0	0.3	0.3	0.1	0.2	0.8	0.1	0.4	0.1	0.4	0.4	NQ	NQ	0.2

NQ: niveles por debajo del límite de cuantificación

En la tabla 9, se muestra la media de las concentraciones plasmáticas de ambas especialidades obtenidas en diferentes tiempos de muestreo.

Tabla 9. Media de las concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) en terneras tras la administración i.m. de una dosis de 30 mg/kg p.v. de las dos formulaciones de OTC ensayadas.

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Media \pm DE</i>	
	<i>Formulación A</i>	<i>Formulación B</i>
1	6.6 \pm 3.3	5.5 \pm 1.4
2	9.4 \pm 4.4	8.9 \pm 4.3
3	6.8 \pm 1.5	5.6 \pm 1.2
4	8.4 \pm 2.9	7.5 \pm 3.0
6	6.4 \pm 1.8	6.3 \pm 1.6
8	7.1 \pm 2.2	6.1 \pm 1.9
10	5.7 \pm 1.4	4.9 \pm 1.4
12	4.9 \pm 1.9	5.0 \pm 1.4
24	2.4 \pm 0.8	2.3 \pm 0.8
36	1.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4
48	1.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3
60	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4
72	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1
120	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3
144	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4
168	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
192	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
216	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
240	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2

Al igual que se observó en el estudio previo, trascurrida 1 h de la administración de ambas especialidades las concentraciones plasmáticas medias del fármaco ya se encuentran en niveles de 6.6 \pm 3.3 $\mu\text{g/ml}$ y 5.5 \pm 1.4 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones van aumentando hasta las 4 h postadministración para ambas formulaciones. A partir de este momento, el fármaco empieza a disminuir de forma progresiva, encontrándose OTC en el plasma hasta 10 días después de la administración de ambas formulaciones.

En la tabla 10 se presentan, para su comparación, las concentraciones plasmáticas medias de oxitetraciclina obtenidas en los diferentes tiempos de muestreo del estudio previo y del estudio cinético completo, tras la administración i.m. de la dosis y pauta terapéutica ensayadas.

Tabla 10. Media de la concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de OTC obtenidas para las dos formulaciones ensayadas en los dos estudios realizados en terneras.

<i>Estudio previo (modelo cruzado) (n = 6)</i>			<i>Estudio cinético (modelo paralelo) (n = 14)</i>		
<i>Tiempo (h)</i>	<i>Media \pm DE</i>		<i>Tiempo (h)</i>	<i>Media \pm DE</i>	
	<i>Formulación A</i>	<i>Formulación B</i>		<i>Formulación A</i>	<i>Formulación B</i>
0.16	2.8 \pm 1.2	3.6 \pm 3.1	1	6.6 \pm 3.3	5.5 \pm 1.4
0.33	4.7 \pm 1.3	5.7 \pm 6.2	2	9.4 \pm 4.4	8.9 \pm 4.3
0.5	4.6 \pm 1.8	5.0 \pm 3.1	3	6.8 \pm 1.5	5.6 \pm 1.2
0.75	7.2 \pm 3.4	5.1 \pm 1.8	4	8.4 \pm 2.9	7.5 \pm 3.0
1	7.6 \pm 2.3	5.6 \pm 1.9	6	6.4 \pm 1.8	6.3 \pm 1.6
1.5	6.3 \pm 1.5	5.8 \pm 2.2	8	7.1 \pm 2.2	6.1 \pm 1.9
2	7.1 \pm 0.9	5.3 \pm 1.8	10	5.7 \pm 1.4	4.9 \pm 1.4
2.5	6.9 \pm 2.0	5.7 \pm 2.5	12	4.9 \pm 1.9	5.0 \pm 1.4
3	7.4 \pm 2.2	5.8 \pm 2.8	24	2.4 \pm 0.8	2.3 \pm 0.8
4	6.7 \pm 3.5	6.0 \pm 2.7	36	1.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4
5	6.9 \pm 3.5	6.2 \pm 1.2	48	1.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3
6	8.2 \pm 2.0	7.2 \pm 1.9	60	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4
8	6.9 \pm 2.5	6.3 \pm 1.0	72	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1
10	6.3 \pm 2.4	4.8 \pm 1.4	120	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3
24	2.5 \pm 1.2	2.3 \pm 0.7	144	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4
48	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3	168	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
72	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	192	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
-	-	-	216	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
-	-	-	240	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2

En el estudio previo, a los 10 min postadministración se alcanzaron niveles plasmáticos del orden de 3 $\mu\text{g/ml}$. Estas concentraciones siguieron aumentando de forma progresiva, detectándose niveles plasmáticos alrededor de $6.5 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ transcurrida 1 h postadministración. En el estudio cinético completo, transcurrida 1 h postadministración, los niveles plasmáticos obtenidos son muy similares a los del estudio previo a este mismo tiempo, confirmándose así el comportamiento del fármaco. A partir de este momento, las concentraciones aumentaron de forma progresiva hasta alcanzar la concentración máxima a las dos horas postadministración, cuando se llevó a cabo el estudio cinético completo y a los 6 h postadministración en el estudio previo de ambas formulaciones, aunque cabe remarcar que en ambos estudios, en el intervalo de 2 a 10 h, las concentraciones se mantuvieron muy similares.

A partir de 24 h postadministración, los niveles plasmáticos de ambas especialidades y en ambos estudios, disminuyeron lentamente, detectándose niveles plasmáticos a los 3 días de haber administrado los productos, siendo del orden de 0.7 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, al realizar el estudio completo, a partir de los 3 días se comprobó que los niveles seguían disminuyendo de forma muy lenta, encontrándose niveles de $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ OTC hasta 10 días después de la administración de ambas especialidades.

En las figuras 2 a 31 se han representado las curvas de concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina de cada uno de los animales, así como la media obtenida a partir de los 14 animales tratados, tanto después de la administración de la formulación A como de la formulación B.

En la figura 32 se han representado conjuntamente las curvas medias de ambas formulaciones para poder comparar el perfil conjunto de las dos especialidades administradas.

Figura 2. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 1 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A

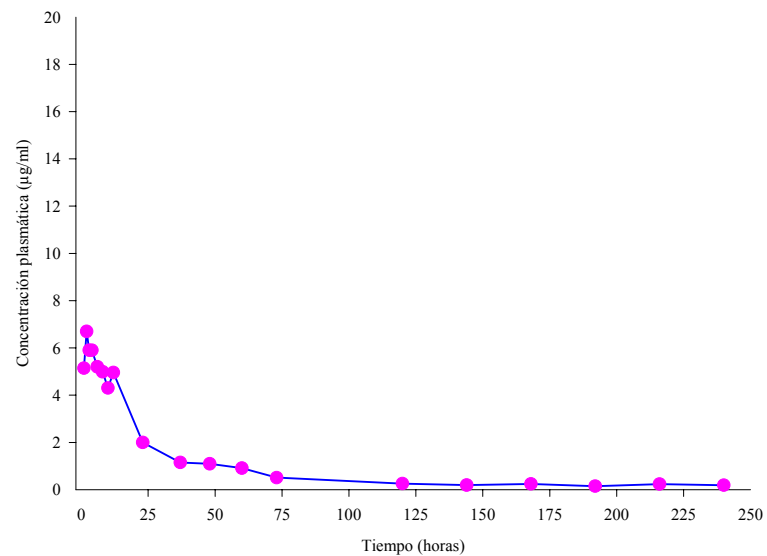


Figura 3: Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 2 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

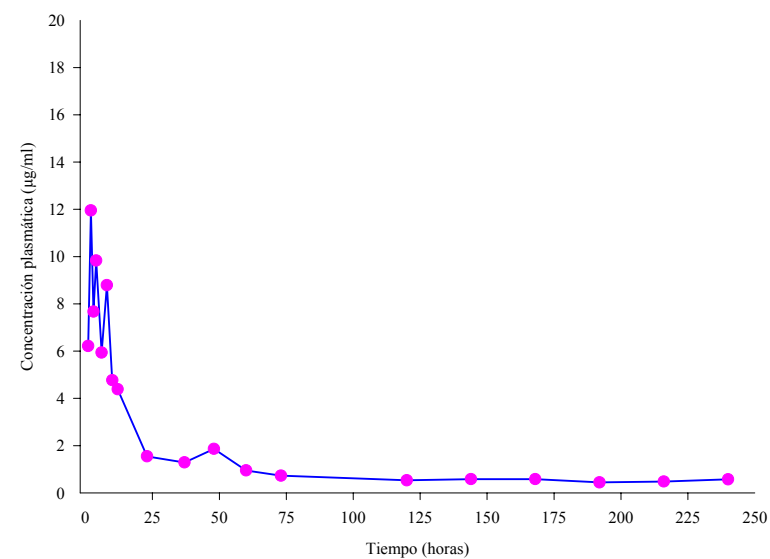


Figura 4. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 3 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

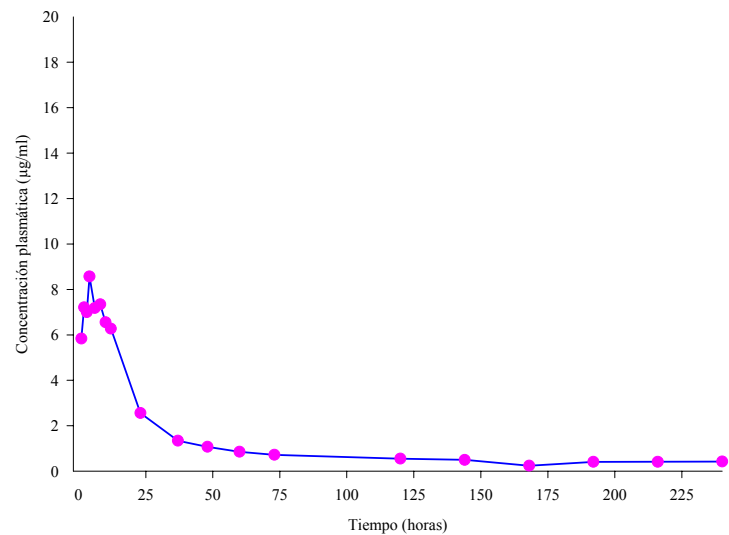


Figura 5. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 4 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

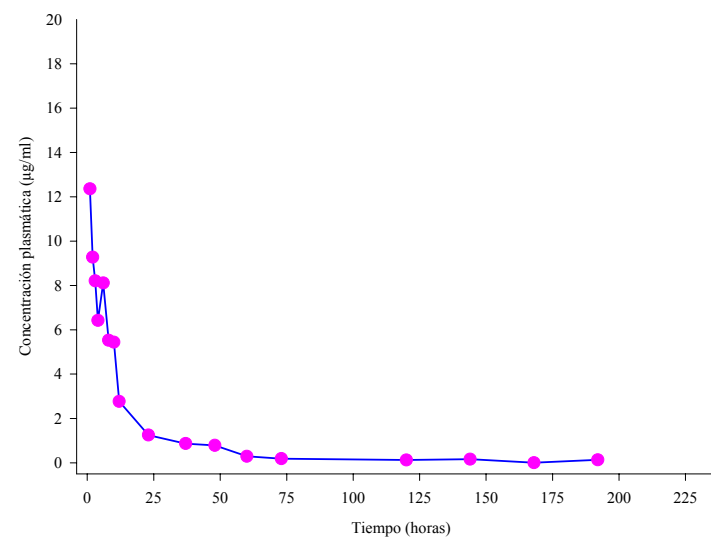


Figura 6. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 5 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

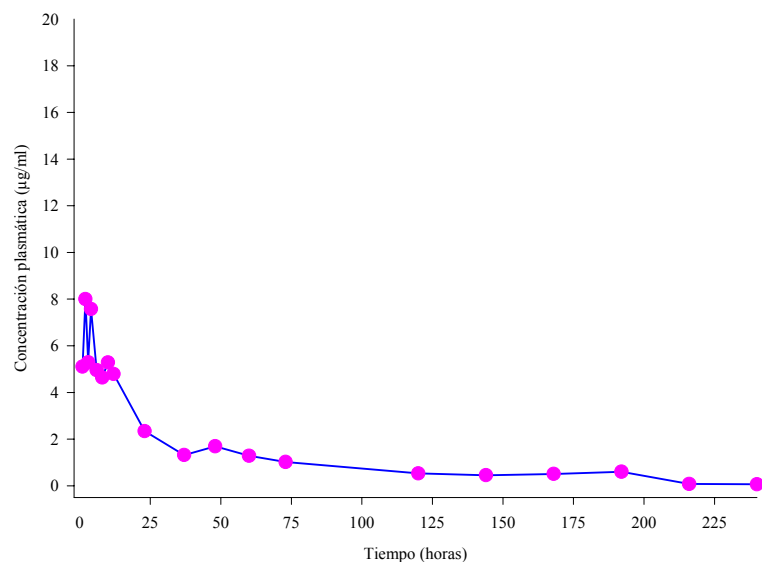


Figura 7. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 6 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

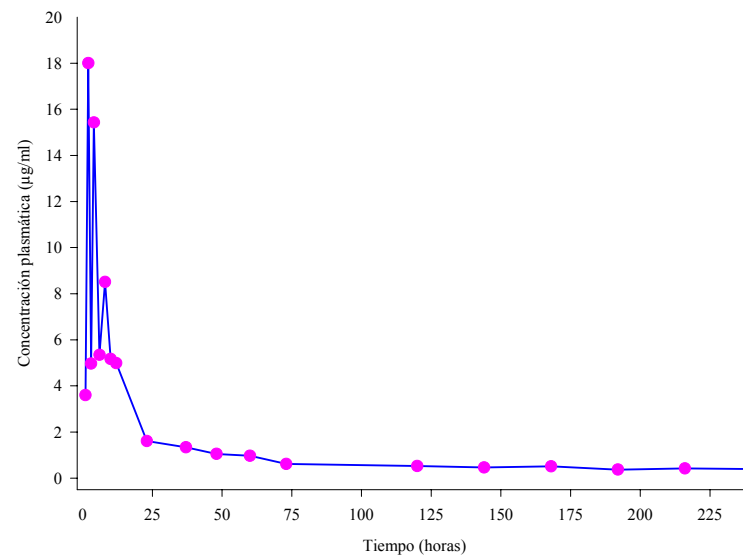


Figura 8: Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 7 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

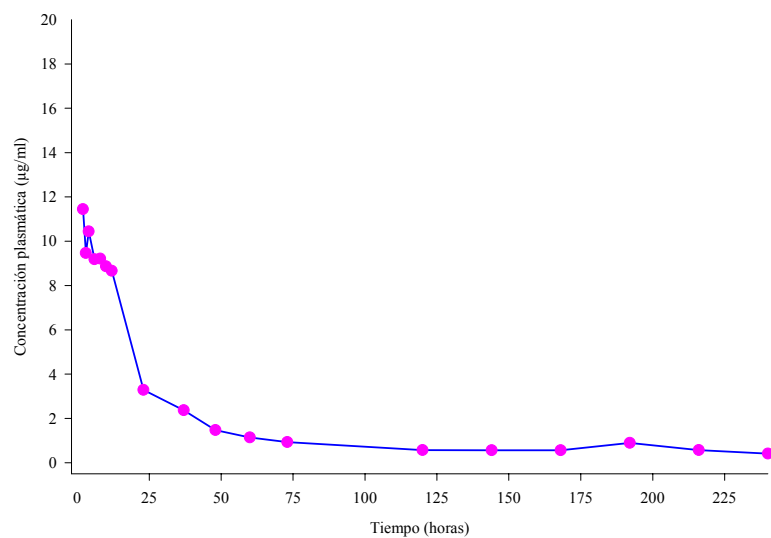


Figura 9. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 10 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

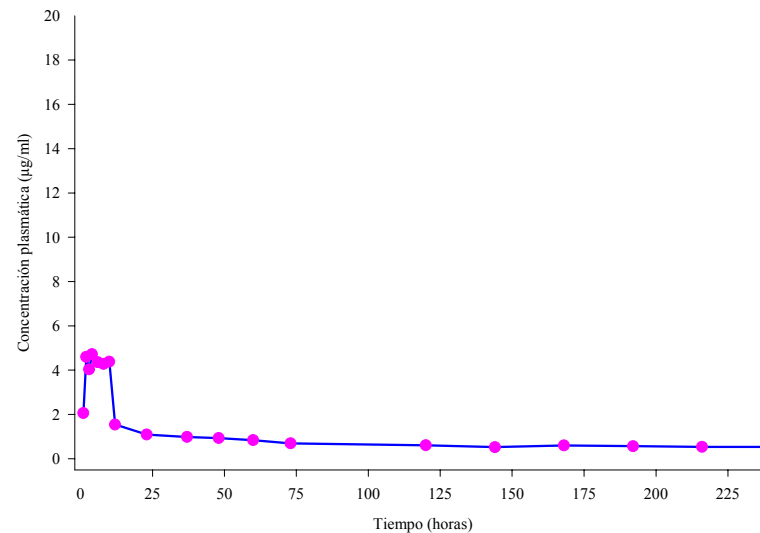


Figura 10. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 17 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

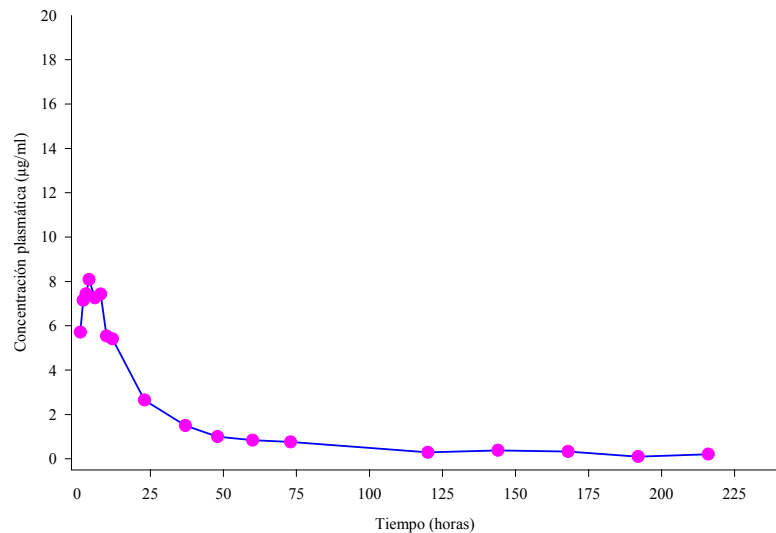


Figura 11. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 18 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

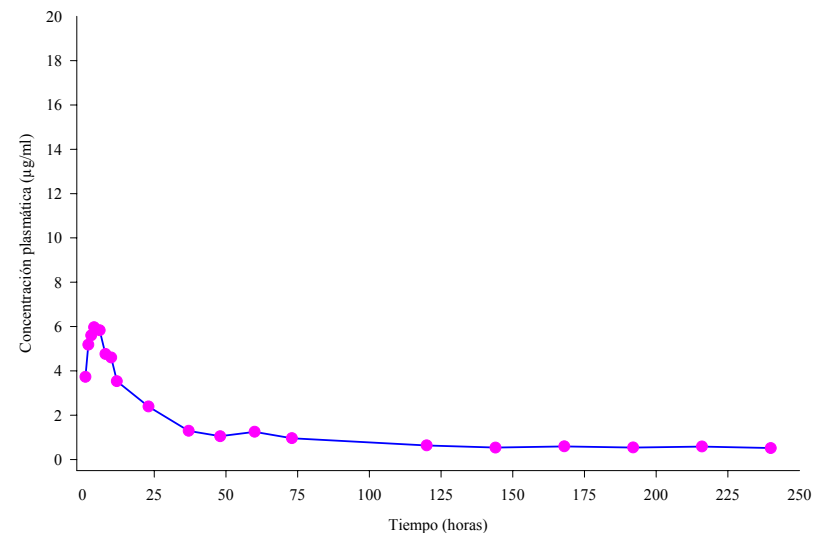


Figura 12. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 19 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

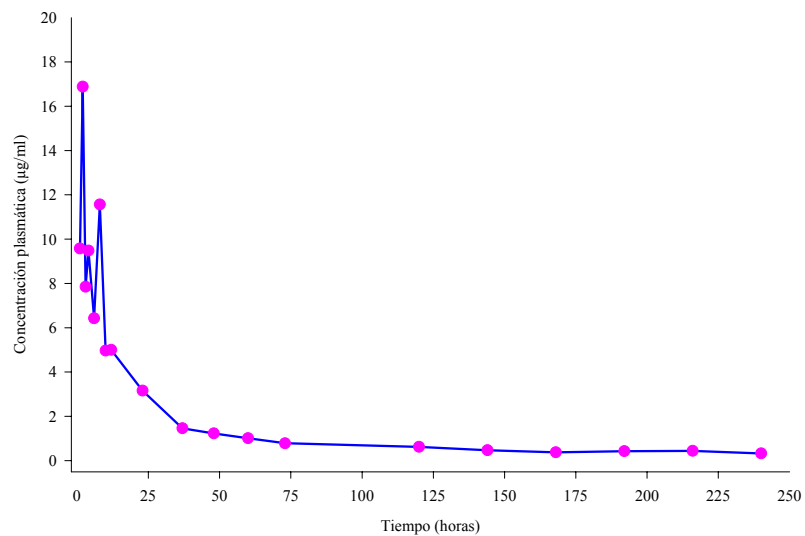


Figura 13. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 20 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

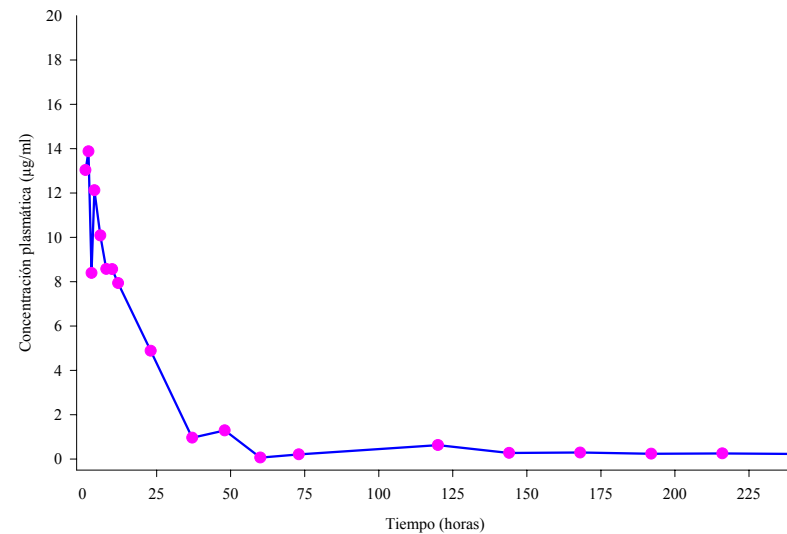


Figura 14. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 21 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

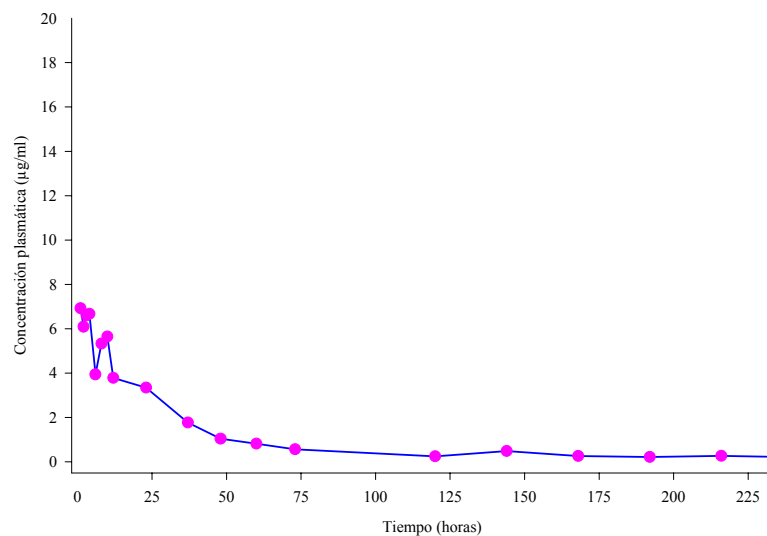


Figura 15. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 22 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

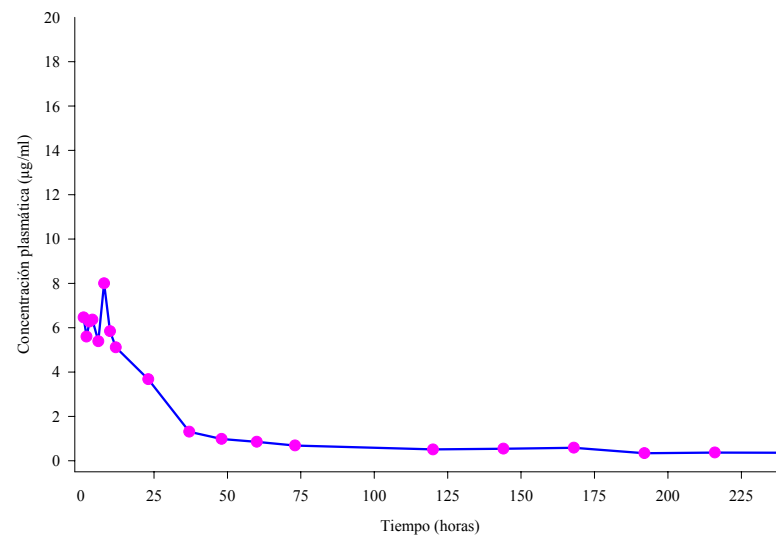


Figura 16. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente la media de los valores obtenidos de las terneras tratadas por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación A.

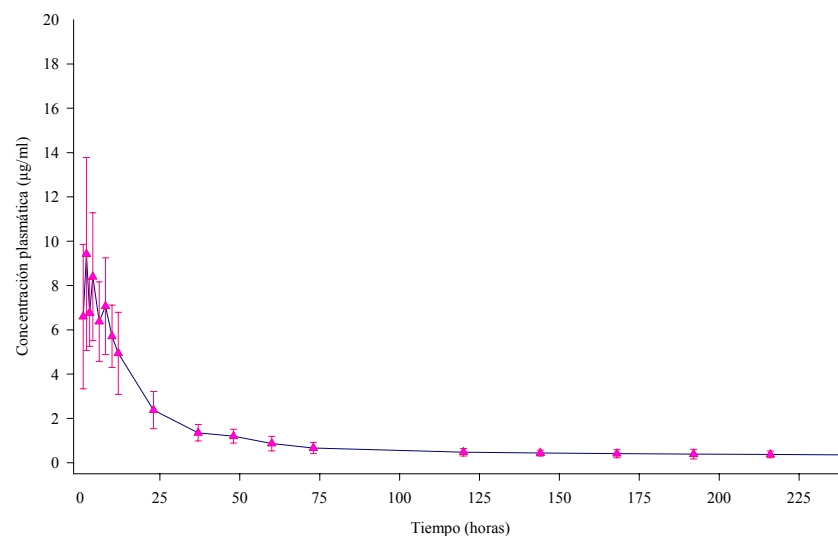


Figura 17. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 8 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

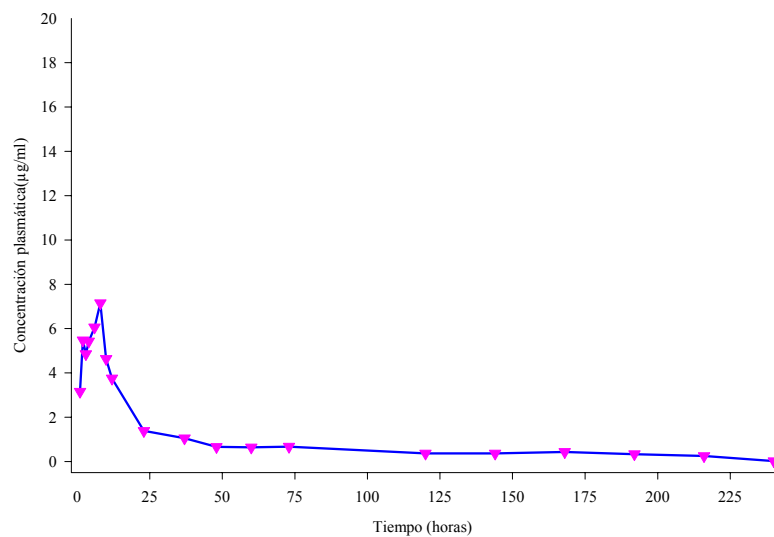


Figura 18. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 9 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

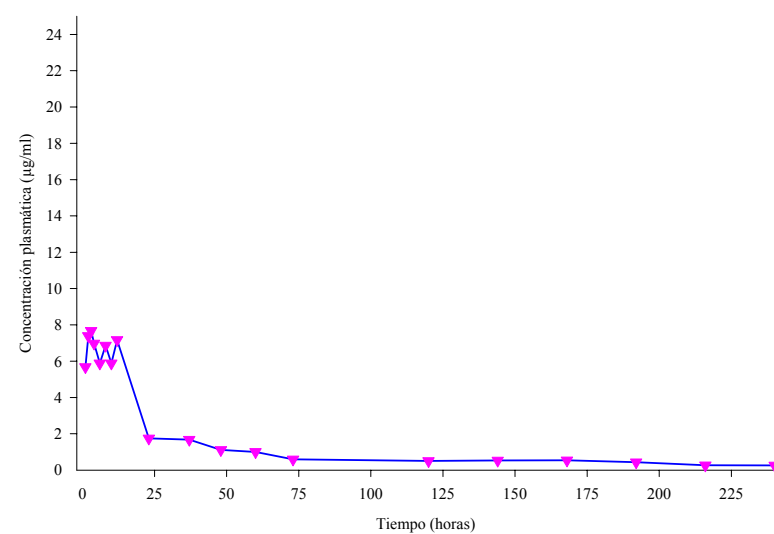


Figura 19. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 11 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

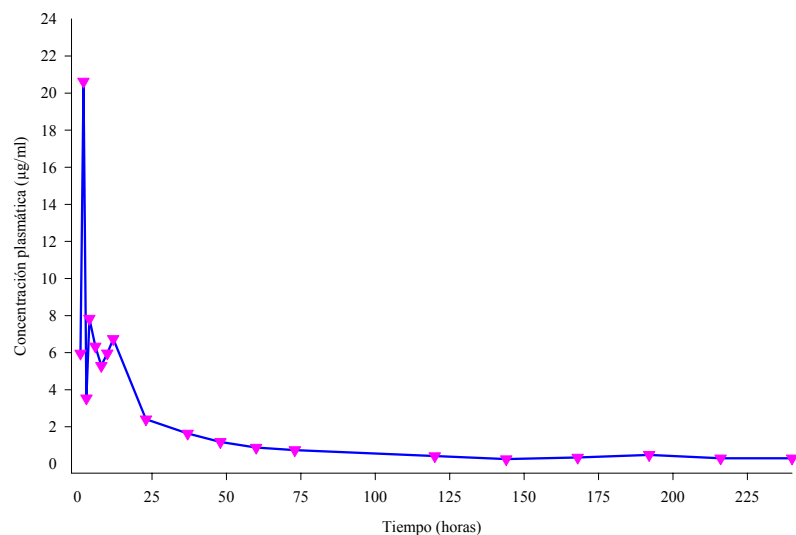


Figura 20. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 12 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

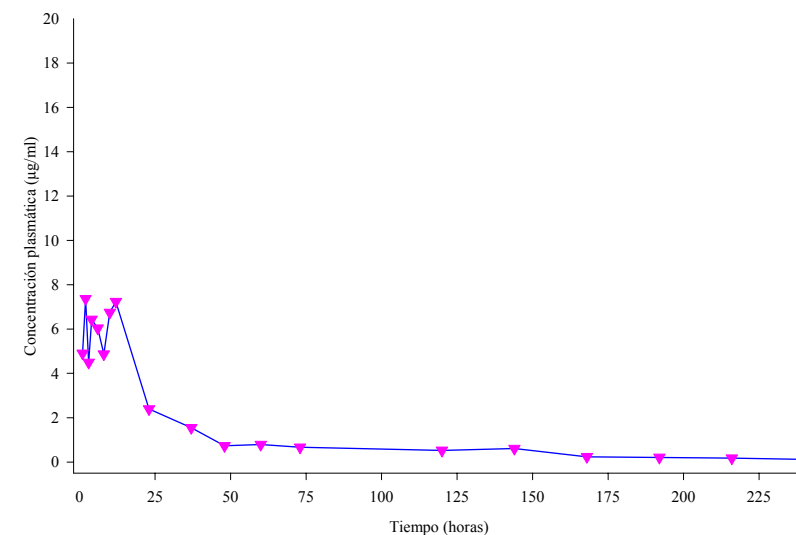


Figura 21. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 13 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

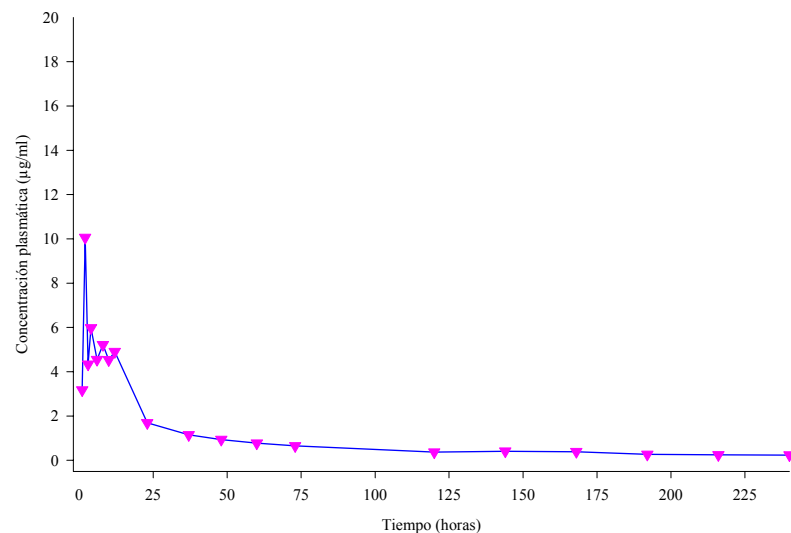


Figura 22. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 14 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

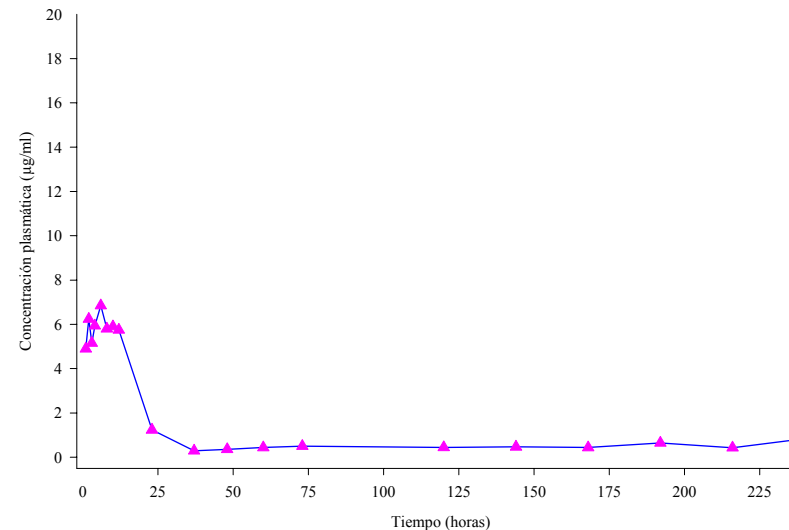


Figura 23. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 15 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

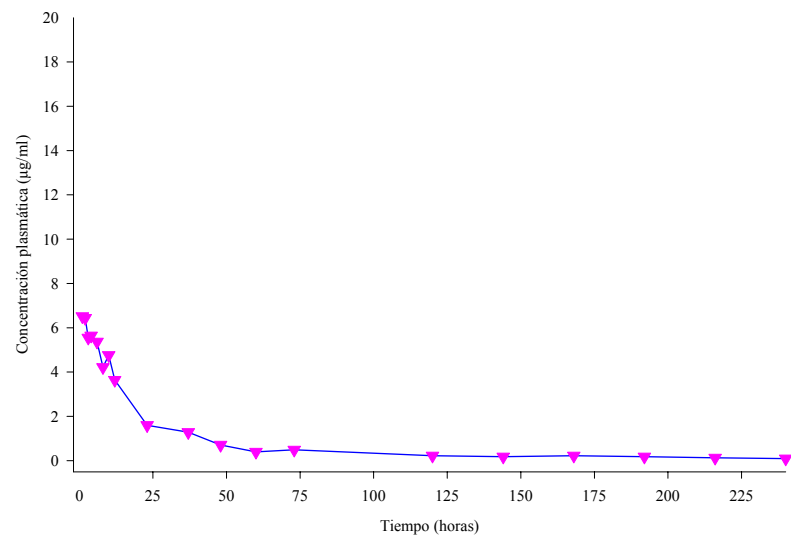


Figura 24. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 16 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B.

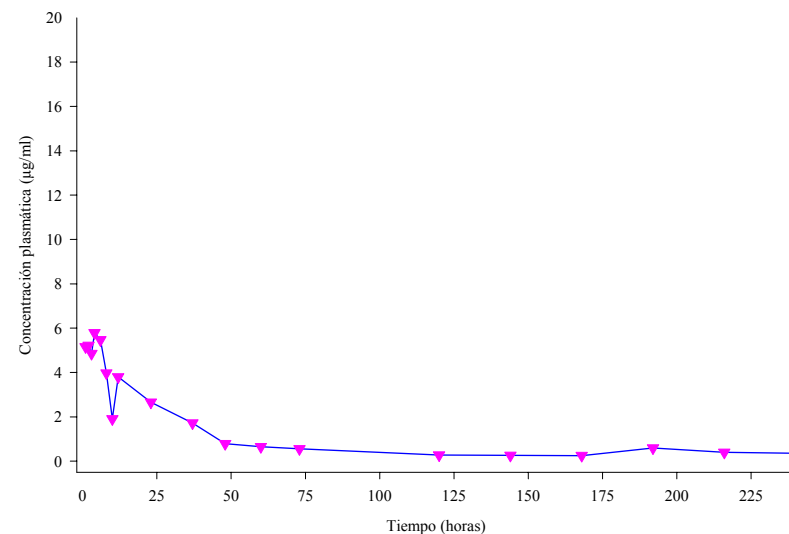


Figura 25. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 23 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

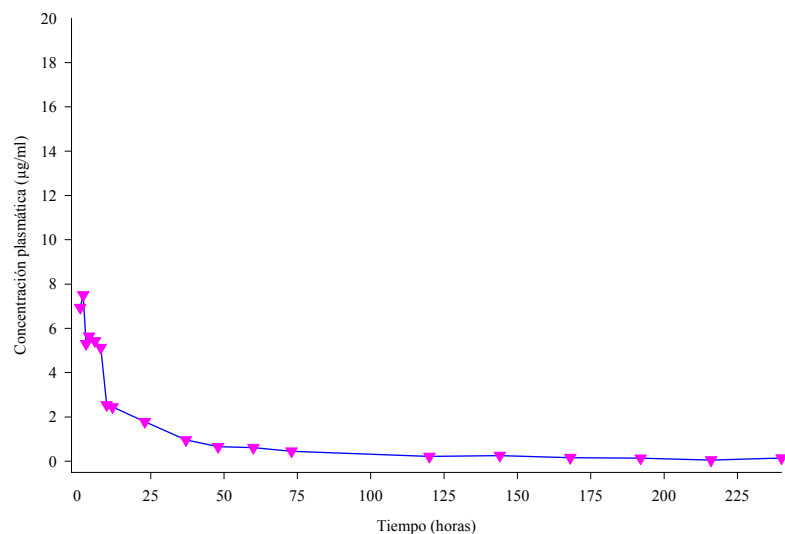


Figura 26. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 24 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

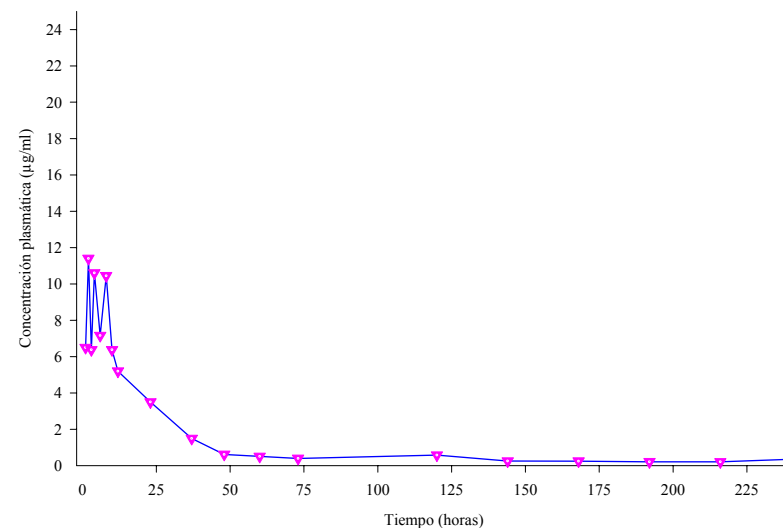


Figura 27. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 25 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

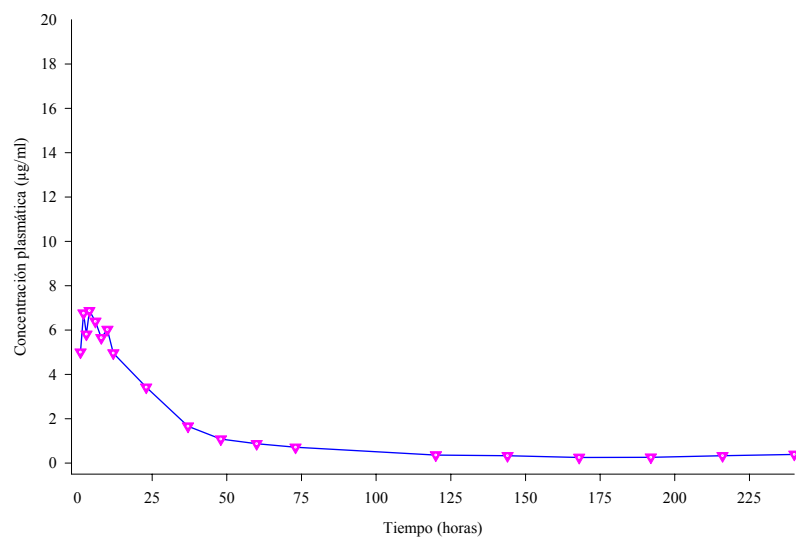


Figura 28. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 26 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

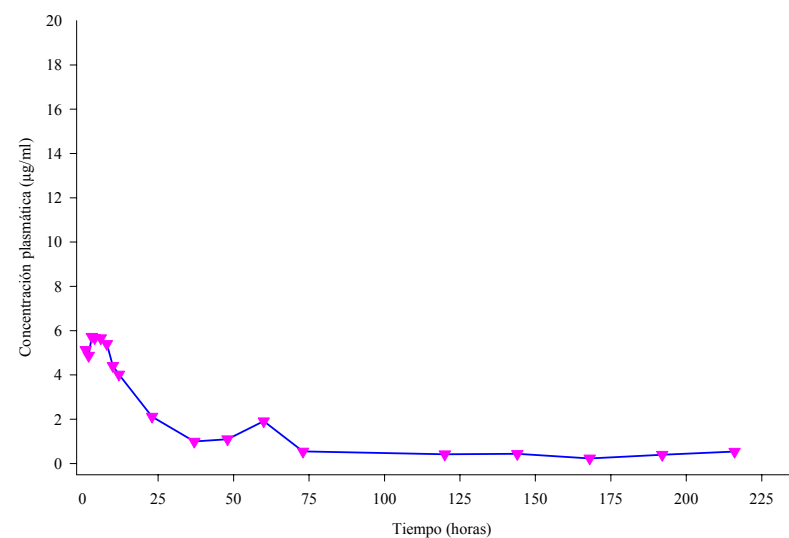


Figura 29. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 27 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

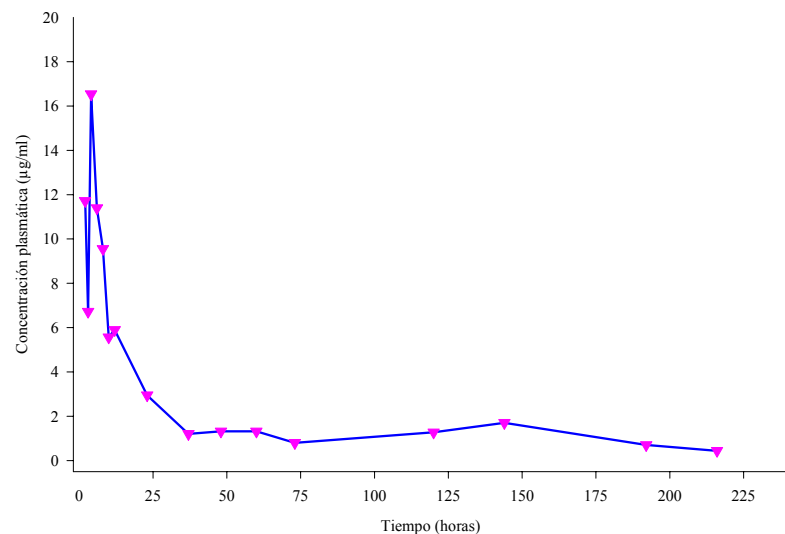


Figura 30. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente de ternera 28 tratada por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

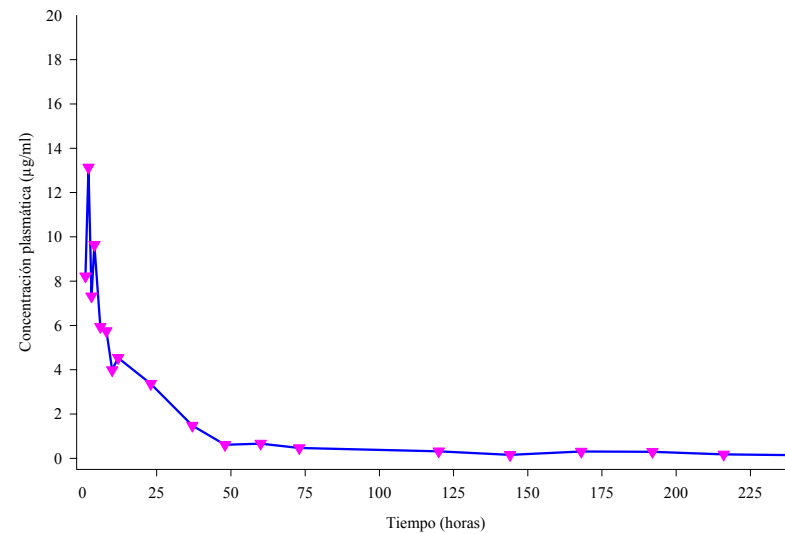


Figura 31. Curva de concentración/tiempo en plasma procedente la media de los valores obtenidos de las terneras tratadas por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en la formulación B

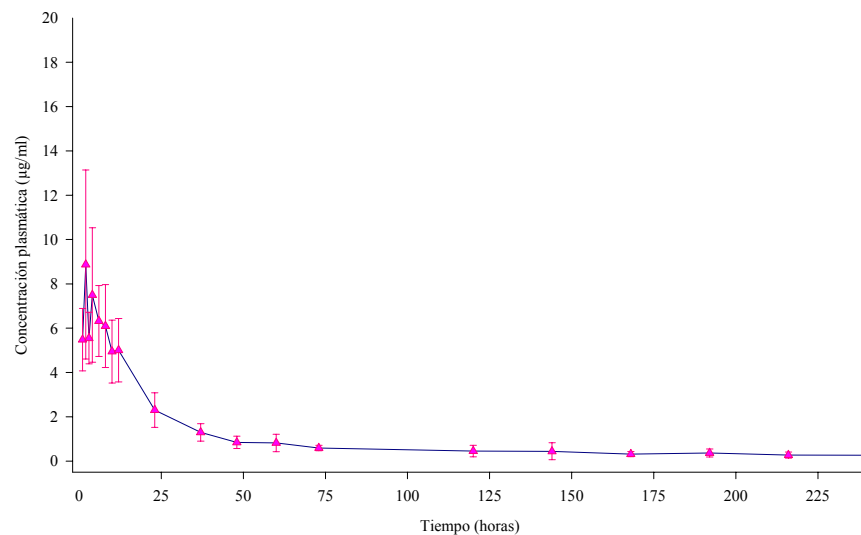
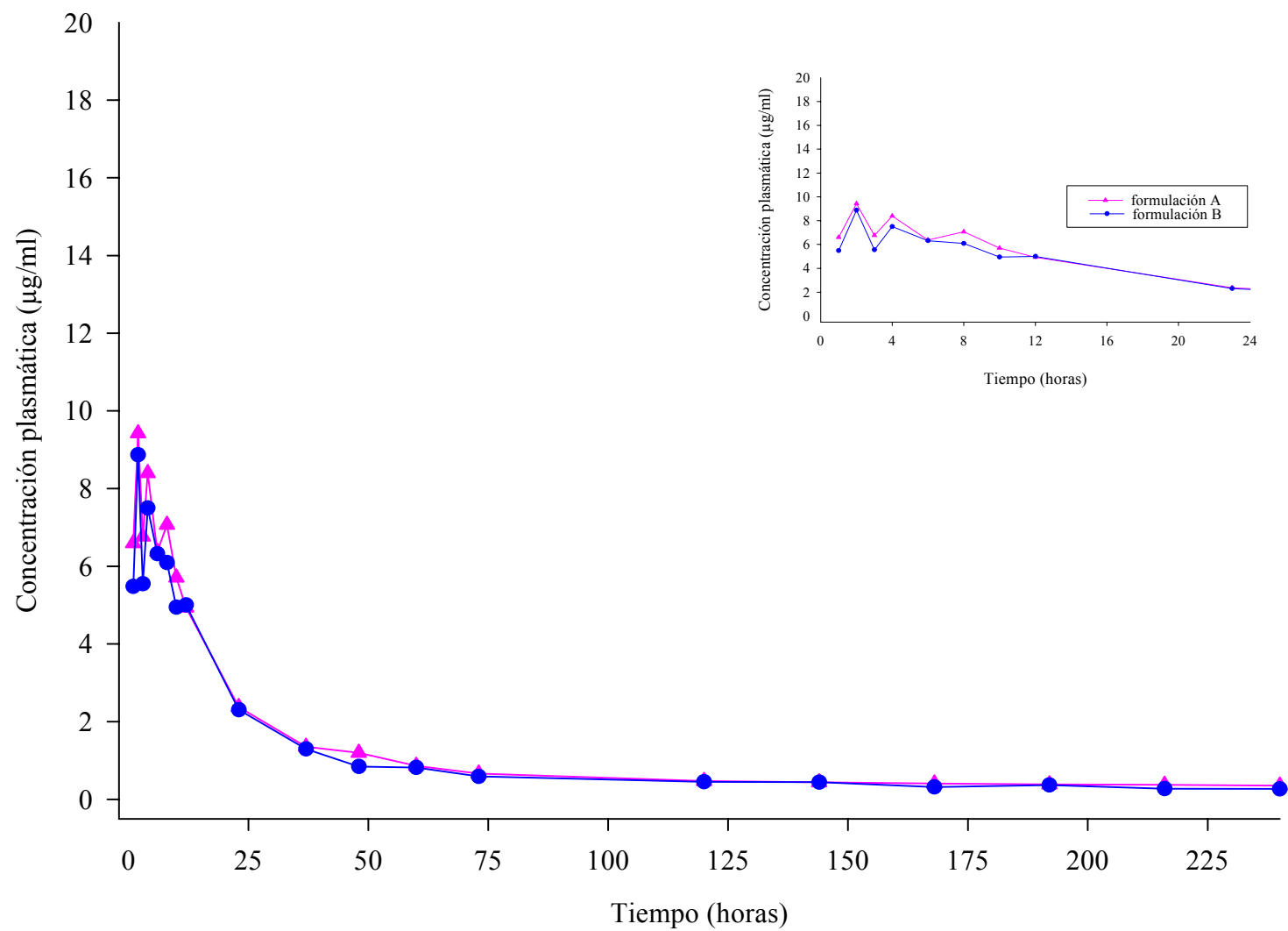


Figura 32. Curvas de concentración/tiempo en plasma procedente la media de los valores obtenidos de las terneras tratadas por vía intramuscular con una dosis de 30 mg/kg del antibiótico, preparado en las formulaciones A y B



Como puede observarse a partir de la curva media de niveles plasmáticos respecto al tiempo, tras la administración i.m. de una dosis única de OTC de 30 mg/kg p.v., en sus formulaciones A y B, se obtienen concentraciones en el plasma después de una hora de la inyección de ambas especialidades a terneras del orden de 6.6 ± 3.3 $\mu\text{g/ml}$ y 5.5 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se observa como alcanza la C_{max} media en ambas formulaciones aproximadamente a las 3 h, llegando a niveles próximos a 10 ± 4 $\mu\text{g/ml}$. Como ya se ha comentado, gráficamente se observa la disminución progresiva de los niveles plasmáticos a partir del tiempo de concentración máxima y hasta las 24 h postadministración, descendiendo muy lentamente hasta los 10 días de haber administrado ambas especialidades.

Puede observarse como, al representar las dos curvas de concentraciones plasmáticas medias, ambas tienen un perfil muy similar, siendo superponibles durante prácticamente todo el periodo de muestreo.

IV.1.2.2. Estudio farmacocinético

En las tablas 11 y 12 se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos del análisis de las curvas de niveles plasmáticos de cada uno de los animales estudiados, así como la media obtenida de los parámetros de los 14 animales tratados con cada una de las dos formulaciones a la dosis señalada. Los parámetros analizados fueron el AUC, la C_{max} , el MRT, la $t_{1/2\beta}$ y el T_{max} .

Tabla 11: Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina en terneras después de la administración de la formulación A a una dosis única de 30 mg de oxitetraciclina/kg p.v.

Parámetros farmacocinéticos	Animales													
	Ternera 1	Ternera 2	Ternera 3	Ternera 4	Ternera 5	Ternera 6	Ternera 7	Ternera 10	Ternera 17	Ternera 18	Ternera 19	Ternera 20	Ternera 21	Ternera 22
AUC_0^{∞} (μg.h/ml)	216.9	386.2	342.7	152.2	266.0	342	433.2	386.1	239.5	374.9	354.5	369.3	251.3	332.6
$AUC_0^{10\text{días}}$ (μg.h/ml)	197.3	274.5	271.0	152.2	261.4	270.7	364.9	203.3	239.5	262.2	302.0	304.5	228.3	270.4
$AUC_0^{3\text{días}}$ (μg.h/ml)	156.0	181.8	194.2	137.9	178.4	186.3	257.1	104.3	187.5	156.4	217.2	217.4	172.5	189.1
T_{\max} (h)	2	2	4	1	2	2	2	4	4	4	2	2	1	8
C_{\max} (μg/ml)	6.7	12	8.6	12.4	8	18	11.5	4.7	8.1	6	16.9	13.9	6.9	8
MRT (h)	74.2	172.2	130	27,5	63	132.9	114.4	321.4	44.1	189.8	106.2	124.6	78.4	125.4
$t_{1/2\beta}$ (h)	72	134.9	116.9	37.1	50.2	125	114.3	237.6	57.9	151.4	111.6	196.7	76.8	120.3

C_{\max} : concentración máxima; T_{\max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $AUC_0^{10\text{ días}}$: área bajo la curva hasta 10 días; MRT: tiempo medio de residencia; $t_{1/2\beta}$: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación

Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina en terneras después de la administración de la formulación B a una dosis única de 30 mg de oxitetraciclina/kg p.v.

Parámetros farmacocinéticos	Animales													
	Tenera 8	Tenera 9	Tenera 11	Tenera 12	Tenera 13	Tenera 14	Tenera 15	Tenera 16	Tenera 23	Tenera 24	Tenera 25	Tenera 26	Tenera 27	Tenera 28
AUC_0^{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	195.7	298.5	310.4	257.2	241.0	206.3	177.9	260.8	168.9	296.4	301.7	227.1	496.1	252.2
$AUC_0^{10\text{días}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	194.4	264.8	270.6	246.2	209.8	215.9	169.3	210.4	157.5	257.0	249.9	227.1	385.5	230.1
$AUC_0^{3\text{días}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	133.7	188.7	201.3	181.0	147.7	132.7	131.9	147.8	123.1	200.4	188.6	159.5	222.9	183.3
T_{max} (h)	8	3	2	2	2	2	1	4	2	2	4	3	4	2
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.1	7.7	20.6	7.4	10.1	6.2	6.5	5.8	7.5	11.4	6.9	5.7	16.5	13.1
MRT (h)	59.9	92.9	93.2	62.2	97.6	-	59.1	124,2	63.2	86.1	107.2	61	156.4	74.3
$t_{1/2\beta}$ (h)	56.5	91.2	91.9	65.5	91.4	-	66.5	97.9	55.5	78	92	100.4	172.2	102.3

C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $AUC_0^{10\text{días}}$: área bajo la curva hasta 10 días; MRT: tiempo medio de residencia; $t_{1/2\beta}$: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación

En la tabla 13, se presenta la media de los diferentes parámetros farmacocinéticos, resultado del análisis de las curvas plasmáticas de los 28 animales y para ambas especialidades administradas, obtenidos a partir de los resultados descritos en las tablas 11 y 12.

Tabla 13: Media de los parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina obtenida tras el tratamiento de las terneras con la formulaciones A y B a una dosis de 30 mg/kg por vía *i.m.*

Parámetros Farmacocinéticos	Media ± DE	
	Formulación A	Formulación B
C_{max} (µg/ml)	10.1± 4.1	9.5 ± 4.5
T_{max} (h)	2.9 ±1.8	2.9 ± 1.7
AUC₀^{3días} (µg.h/ml)	181.2 ± 36.9	167.3 ± 31.7
AUC₀^{10días} (µg.h/ml)	257.3 ± 52.1	234.9 ± 54.9
AUC₀[∞] (µg.h/ml)	317.7 ± 79.5	263.6 ± 81.4
MRT₀^{10 días} (h)	121.7±73.4	87.5 ± 29.3
t_{1/2β} (h)	114.5±55.7	89.3 ± 29.8

C_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo correspondiente a la concentración máxima; AUC₀^{3 días}: área bajo la curva hasta 3 días; MRT: tiempo medio de residencia; t_{1/2β}: semivida biológica correspondiente a la fase terminal de eliminación.

Según los resultados de los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de las concentraciones plasmáticas de OTC en terneras, se puede observar que tanto el AUC₀[∞] como el AUC₀^{10 días}, son similares en ambas formulaciones, así como lo son también la C_{max} y el T_{max}. En cambio, el MRT y el t_{1/2β} de la formulación A son ligeramente superiores que los de la formulación B.

De nuevo al comparar el AUC₀^{3 días} en el estudio previo y en el estudio completo se confirmó el comportamiento similar de la molécula a nivel plasmático en ambos ensayos (intervalo del AUC se encuentra entre 173 y 188 µg.h/ml en el estudio previo y entre 167 y 181 µg.h/ml en el estudio completo).

IV.1.2.3. Análisis estadístico de la bioequivalencia

El resultado obtenido del cálculo de los intervalos de confianza del 90% permitió evaluar la bioequivalencia entre las dos especialidades administradas. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Intervalo de confianza del 90% calculado a partir de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras administrar las formulaciones A y B de OTC a terneras.

Parámetro	Intervalo (%) según especialidad
$AUC_0^{10 \text{ días}}$	95.6 – 101.2
AUC_0^{∞}	100.0 – 106.9
C_{max}	90.4 – 121.3
T_{max}	66.7 – 141.4

Como se puede observar en los resultados obtenidos del cálculo de los intervalos de confianza del 90 %, todos los parámetros estudiados, excepto el Tmax, se encuentran dentro del rango fijado por la *Guideline* para la evaluación de estudios de bioequivalencia entre especialidades veterinarias (entre 80 y 125 % para el AUC y la Cmax aunque en este último parámetro podría aceptarse límites de 70 a 143 %). Aunque el Tmax presenta un intervalo de confianza mayor, para este parámetro el intervalo no está fijado por la *Guideline* (EMEA/CVMP/016/00) ya que depende del valor que presente.

IV.1.2.4. Cálculo de la eficacia frente los diferentes microorganismos causantes de enfermedades en bovino

En la tabla 15 se puede observar la CMI (50 y 90), recogida de la bibliografía, de diferentes microorganismos causantes de enfermedades importantes en bovino.

Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de algunos microorganismos obtenida de la bibliografía

<i>Microorganismos</i>	<i>CMI₅₀</i>	<i>CMI₉₀</i>	<i>Autores</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.25	1	(Hannan y cols., 1997)
<i>Pasteurella multocida</i>	0.78	3.13	(Yoshimura y cols., 2001)
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	0.296	0.533	(Loria y cols., 2003)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78	1.56	(Yoshimura y cols., 2002a)
<i>Actinobacillus pleuropneumoni</i>	0.78	-	(Yoshimura y cols., 2002b)
<i>Arcanobacterium pyogene</i>	0.25	8	(Trinh y cols., 2002)
<i>Leptospira Spp</i>	1	4	(Prescott y Baggot, 2000)
<i>Moraxella bovis</i>	0.64	-	(Prescott y Baggot, 2000)

En las tablas 16 y 17, se pueden observar los índices de eficacia correspondientes a la administración de oxitetraciclina a un dosis de 30 mg/kg por vía i.m. para cada uno de los microorganismos causantes de las enfermedades mas importantes para esta especie y para cada formulación.

Tabla 16. Índices de eficacia de oxitetraciclina (formulación A) administrada a un dosis de 30 mg/kg a terneras para los diferentes microorganismos.

<i>Microorganismos</i>	<i>Parámetros</i>					
	<i>C_{max}/CMI₅₀</i>	<i>AUC_{0-24h}/CMI₅₀</i>	<i>T>CMI₅₀</i> (%)	<i>C_{max}/CMI₉₀</i>	<i>AUC_{0-24h}/CMI₉₀</i>	<i>T>CMI₉₀</i> (%)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	40.40	102.92	100	10.10	25.73	23.21
<i>Pasteurella multocida</i>	12.95	32.98	27.37	3.23	8.22	8.3
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	34.12	86.92	100	18.94	48.27	41.66
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.95	32.98	27.1	6.47	16.49	14.58
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	12.95	32.98	26.6	-	-	-
<i>Arcanobacterium pyogene</i>	40.40	102.92	100	1.26	3.21	-
<i>Leptospira Spp</i>	10.10	25.73	23.21	2.52	6.43	7.14
<i>Moraxella Bovis</i>	15.78	40.20	34.52	-	-	-

Se considera eficaz si los parámetros: $C_{max}/CMI > 10$; $AUC_{0-24h}/CMI > 125$ ó $AUC_{0-24h}/CMI = 25-30$; $T > CMI = 50\%$, según Sánchez, 2000 y Gunderson y cols 2001 / Craig 2003).

Tabla 17. Índices de eficacia de oxitetraciclina (formulación B) administrada a un dosis de 30 mg/kg a terneras para los diferentes microorganismos.

Microorganismos	Parámetros					
	C_{max}/CMI_{50}	AUC_{0-24h}/CMI_{50}	$T>CMI_{50}$ (%)	C_{max}/CMI_{90}	AUC_{0-24h}/CMI_{90}	$T>CMI_{90}$ (%)
<i>Micoplasma hyopneumoniae</i>	38	93.96	100	9.50	23.50	19.04
<i>Pasteurella multocida</i>	9.50	23.50	25.30	3.03	7.50	8.33
<i>Micoplasma agalactiae</i>	32.09	79.35	100	17.82	44.07	34.82
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.18	30.13	25.30	6.08	15.06	13.98
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	12.18	30.13	25.30	-	-	-
<i>Arcanobacterium pyogene</i>	38	93.96	100	1.18	2.93	-
<i>Leptospira Spp</i>	9.5	23.50	19.04	2.37	5.87	6.54
<i>Moraxella Bovis</i>	14.84	36.72	30.35	-	-	-

Se considera eficaz si los parámetros: $C_{max}/CMI > 10$; $AUC_{0-24h}/CMI > 125$ ó $AUC_{0-24h}/CMI = 25-30$; $T > CMI = 50\%$, según Sánchez, 2000 y Gunderson y cols 2001/ Craig 2003).

Según Craig (2003), y como se puede observar en las tablas 16 y 17, el índice AUC_{0-24h}/CMI indica que la OTC sería eficaz para la formulación A en la mayoría de los microorganismos en el caso de la CMI_{50} . En la formulación B, este índice no se cumple para *Pasteurella multocida* y *Leptospira spp*.

Cuando se evalúa la eficacia teniendo en cuenta la CMI_{90} , este índice se cumple sólo para *Micoplasma hyopneumoniae* y *Micoplasma agalactiae*, en el caso de la formulación A y para *Micoplasma agalactiae* en la formulación B.

Según Gunderson y cols (2001) y Sánchez (2000) el índice AUC_{0-24h}/CMI no se cumple para ningún microorganismo estudiado cuando se tiene en cuenta la CMI_{50} .

Si se considera el índice $T > CMI$, éste se cumple para *Micoplasma hyopneumoniae*, *Micoplasma agalactiae* y *Ureaplasma spp*, en el caso de de la CMI_{50} , y sólo para *Ureaplasma spp*, en el caso de CMI_{90} , para ambas formulaciones.

En la tabla 18, se pueden observar los intervalos en los que las concentraciones pulmonares están por encima de las CMIs de los microorganismos estudiados para las formulaciones A y B, obtenidas a partir de la relación concentración plasmática: concentración pulmonar (2:1) que describen los autores (Ames y Patterson, 1985; Terhune y Upson, 1989).

Tabla 18. Intervalo en horas en el que las concentraciones pulmonares están por encima de CMI.

<i>Microrganismos</i>	<i>Formulación A</i>		<i>Formulación B</i>	
	<i>MIC₅₀</i>	<i>MIC₉₀</i>	<i>MIC₅₀</i>	<i>MIC₉₀</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1 h – 120 h	1 h – 24 h	1 h – 120 h	1h – 24 h
<i>Pasteurella multocida</i>	1 h – 24 h	1 h – 8 h	1 h – 24 h	1 h – 6 h
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	1 h – 72 h	1 h – 48 h	1 h – 72 h	1 h – 36 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 h – 24 h	1 h – 12 h	1 h – 24 h	1 h – 12h
<i>Actinobacillus pleuropneumoni</i>	1 h – 24 h	-	1 h – 24 h	-
<i>Arcanobacterium pyogene</i>	1 h – 120h		1 h – 120 h	
<i>Leptospira Spp</i>	1 h – 24 h	1 h – 4 h	1h – 24 h	-
<i>Moraxella bovis</i>	1 h – 36 h	-	1 h – 36 h	

Tabla 19. Datos preliminares y no publicados de resistencia a tetraciclinas en patógenos respiratorios porcinos cedidos por el Laboratorio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria¹

Especie Bacteriana	% R Doxiciclina	% R Tetraciclina	% R oxitetraciclina
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-	-	96.8
<i>Actinibacillus pleuropneumoniae</i>	-	66.6	-
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	12	69.9	-
<i>Pasteurella multocida</i>	5.8	-	-
<i>Haemophilus parasuis</i>	16.5	-	-
<i>Streptococcus suis</i>	19.6	-	-

¹ Laboratorio de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Facultad Veterinaria de la U.C.M

IV.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC + 4-epiOTC EN TERNERAS

IV.2.1. Estudio de residuos en ternera

IV.2.1.1. Concentraciones tisulares

En las tablas 20 a 23 se pueden observar las concentraciones tisulares de OTC +4-epiOTC obtenidas tras analizar los diferentes tejidos diana, procedentes de animales tratados por vía i.m. a una dosis única de 30 mg/kg de la formulación A. Los animales fueron sacrificados en 3 lotes de 4 animales a 28, 35 y 42 días post-tratamiento.

Tabla 20. Concentraciones de OTC+4-epiOTC en el músculo de terneras tratadas por vía i.m. con la formulación A de OTC a una dosis única de 30 mg/kg p.v.

Día de sacrificio (Nº de lote)	Concentración de OTC+ 4-epi-OTC (µg/g)			
	Animal			
	Ternera 1	Ternera 2	Ternera 3	Ternera 4
28 días (Lote 1)	0.072	NQ	0.016	0.075
35 días (Lote 2)	0.064	NQ	0.210	0.062
42 días (Lote 3)	0.180	NQ	0.080	0.030

Se puede observar que los niveles detectados en el músculo de los animales tratados y sacrificados a los 28 días del tratamiento están por debajo de LMR de este tejido.

A los 35 y 42 días post-tratamiento uno de los animales sacrificados en cada uno de los tiempos presenta una concentración del fármaco por encima del LMR.

Tabla 21. Concentraciones de OTC+4-epiOTC en el riñón de terneras tratadas por vía i.m. con la formulación A de OTC a una dosis única de 30 mg/kg p.v.

Día de sacrificio (Nº de lote)	Concentración de OTC+ 4-epi-OTC (µg/g)			
	Animal			
	Ternera 1	Ternera 2	Ternera 3	Ternera 4
28 días (Lote 1)	2.46	0.28	0.21	0.86
35 días (Lote 2)	0.14	0.21	0.28	0.26
42 días (Lote 3)	0.11	0.42	0.20	0.36

En el riñón, las concentraciones del fármaco estuvieron en 2 de los animales sacrificados a los 28 días por encima del LMR, aunque a los 35 y 42 días estos niveles disminuyeron por debajo de este valor en todos los animales tratados.

Tabla 22. Concentraciones de OTC+4-epiOTC en el hígado de terneras tratadas por vía i.m. con la formulación A de OTC a una dosis única de 30 mg/kg p.v.

Días de sacrificio (N° de lote)	Concentración de OTC+ 4-epi-OTC ($\mu\text{g/g}$)			
	Animal			
	Ternera 1	Ternera 2	Ternera 3	Ternera 4
28 días (Lote 1)	3.16	0.42	NQ	0.35
35 días (Lote 2)	NQ	0.30	0.28	0.37
42 días (Lote 3)	0.02	0.20	0.24	0.20

Como se muestra en la tabla 22, los animales sacrificados a los 28 días presentaron en el hígado unos niveles superiores al LMR y a los 35 días, 2 de los 4 animales tratados estuvieron en una situación similar. A los 42 días del tratamiento, estos niveles disminuyeron por debajo del valor máximo establecido en todos los animales tratados.

Tabla 23. Concentraciones de OTC+4-epiOTC en el punto de inyección de terneras tratadas por vía i.m. con la formulación A a una dosis única de 30 mg/kg p.v.

Día de sacrificio (N° de lote)	Concentración de OTC+ 4-epi-OTC ($\mu\text{g/g}$)			
	Animal			
	Ternera 1	Ternera 2	Ternera 3	Ternera 4
28 días (Lote 1)	NQ	3.02	146	1.24
35 días (Lote 2)	2.70	1.98	1.46	0.94
42 días (Lote 4)	0.61	0.21	0.62	0.85

En el punto de inyección, las concentraciones del fármaco encontradas en todos los animales y en los diferentes días de sacrificio están muy por encima del LMR.

En las figuras 33 a 36 se ha representado en abscisas los días de sacrificio y en ordenadas el logaritmo neperiano (Ln) de las concentraciones observadas en cada uno de los animales sacrificados en cada período. Asimismo, se ha representado el valor correspondiente al logaritmo del LMR fijado para cada uno de los tejidos diana.

Figura 33: Residuos de oxitetraciclina + 4-epioxitetraciclina en el músculo de terneras tras la administración de una dosis única de 30 mg/kg p.v. en su formulación A

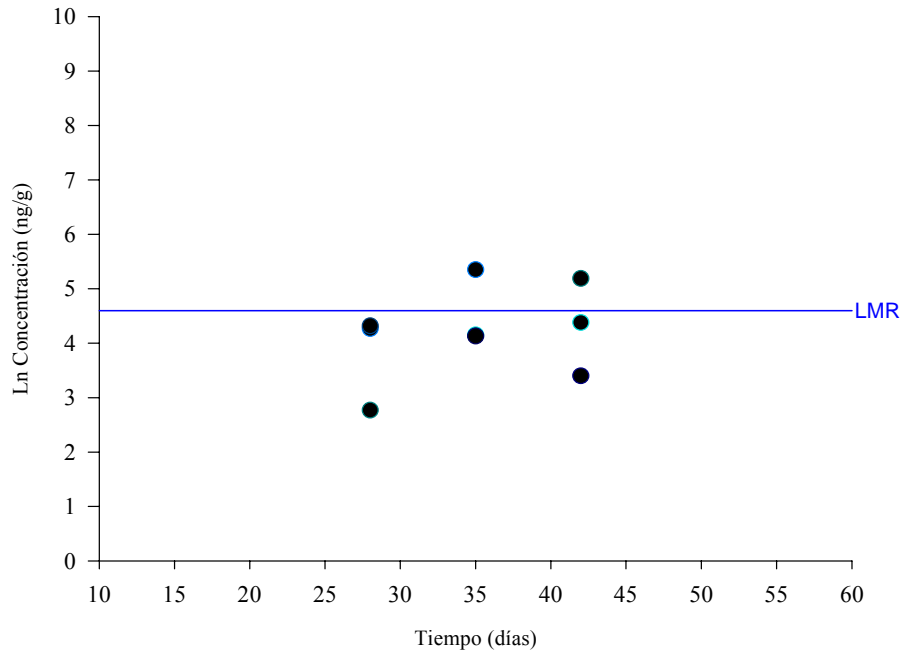


Figura 34: Residuos de oxitetraciclina + 4-epioxitetraciclina en el hígado de terneras tras la administración de una dosis única de 30 mg/kg p.v. en su formulación A

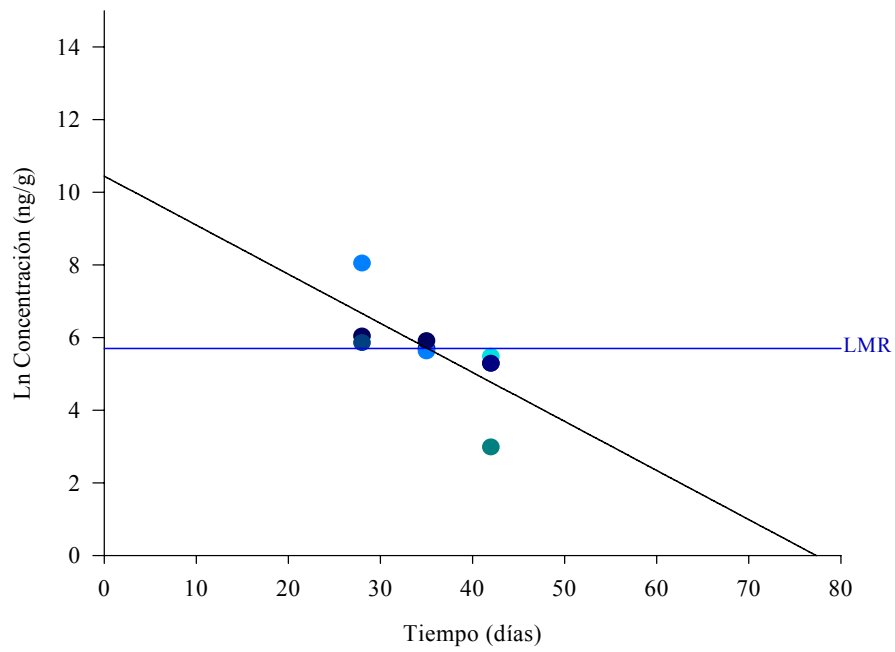


Figura 35: Residuos de oxitetraciclina + 4-epioxitetraciclina en riñón de terneras tras la administración de una dosis única de 30 mg/kg p.v. en su formulación A

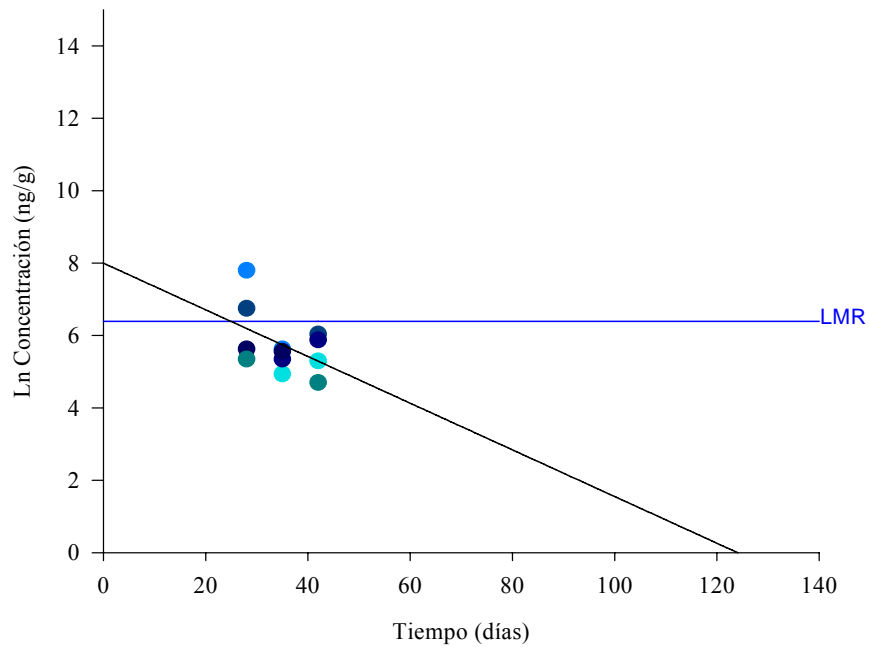
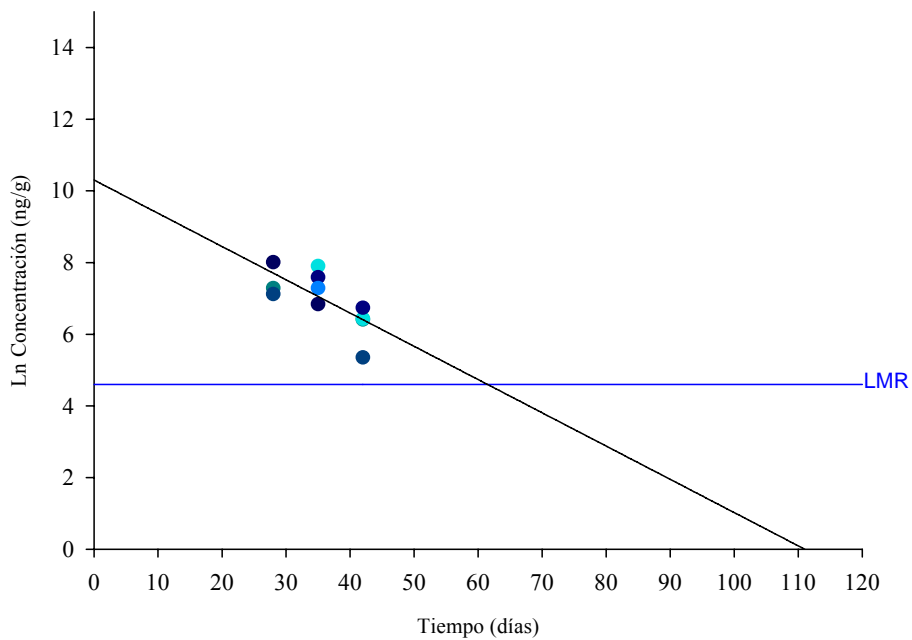


Figura 36: Residuos de oxitetraciclina + 4-epioxitetraciclina en punto de inyección de terneras tras la administración de una dosis única de 30 mg/kg p.v. en su formulación A



Como se puede observar en las figuras, las concentraciones tisulares encontradas en los diferentes tejidos procedentes de terneras, según los días de sacrificio y después de la administración de la formulación A muestran, que el fármaco se elimina de forma lenta de los diferentes tejidos, sobretodo del músculo. A los 42 días postadministración del fármaco aún se encuentran niveles por encima de LMR en el músculo y sobretodo en el punto de inyección procedente de los animales tratados.

IV.2.1.2. Cálculo del tiempo de espera

El cálculo del tiempo de espera, en terneras tratadas con oxitetraciclina a la dosis ensayada, dio como resultado un tiempo de espera de 45.5 días en el caso de riñón y de 54.6 días para el hígado, al aplicar un 30 % de margen de seguridad sobre el periodo de sacrificio en el que todos los animales tienen concentraciones por debajo del LMR (EMEA recomienda la aplicación de un margen de seguridad entre un 10 y un 30%).

En el caso del músculo y el punto de inyección, no se pudo determinar el tiempo de espera de esta especialidad puesto que el último sacrificio realizado presenta concentraciones superiores al LMR en este tejido.

V. DISCUSIÓN

V.1. ESTUDIO DEL PERFIL CINÉTICO DE OXITETRACICLINA TRAS SU ADMINISTRACIÓN I.M. EN TERNERAS

V.1.1. Estudio de la cinética de OTC en plasma de terneras

La evaluación del comportamiento cinético de OTC a través del estudio de las concentraciones plasmáticas del fármaco en terneras, tras administrar dos formulaciones oleosas que se encontraban comercializadas en el mercado español indicó, que trascurrida una 1 h de la administración i.m. de las dos especialidades, a una dosis de 30 mg/kg p.v., las concentraciones de oxitetraciclina en el plasma eran del orden de 6.6 ± 3.3 $\mu\text{g/ml}$ para la formulación A y 5.5 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$ para la formulación B, valores similares a los observados en el estudio previo llevado a cabo, en el cual se tomaron muestras cada 15 min, durante la primera hora postadministración y observándose que ya a este tiempo se alcanzaban concentraciones de 2.8 ± 1.2 $\mu\text{g/ml}$ y de 3.6 ± 3.1 $\mu\text{g/ml}$ tras la administración de las formulaciones A y B, respectivamente.

La C_{max} obtenida tras el análisis estadístico (10.1 ± 4.1 $\mu\text{g/ml}$) fue similar a la encontrada por otros autores tras la administración i.m. de 20 y 40 mg/kg de OTC, en forma retardada, a terneros de 240 kg (Archimbault y cols., 1989; Terhune y Upson, 1989). Pero cuando se administró una formulación acuosa a una dosis de 20 mg/kg, se pudo observar que el antibiótico alcanzaba valores de la C_{max} de 2.6 $\mu\text{g/ml}$ a las 2 h postadministración (Maritim y cols., 1986).

En el estudio llevado a cabo, la C_{max} media se presentó alrededor de las 3 h, y las concentraciones plasmáticas se mantuvieron similares durante un intervalo de más de 12h postadministración, observándose niveles detectables hasta los 10 días posteriores a la inyección del fármaco.

Es conocido que la OTC es un antibiótico liposoluble, que se absorbe y distribuye con gran facilidad, por lo que cabría esperar una rápida absorción. En el presente estudio, las formulaciones utilizadas fueron oleosas y fueron administradas por vía i.m., razón por la cual ven retrasada de forma significativa su velocidad de absorción. Los resultados obtenidos se ajustan a esta premisa, demostrándose el efecto retardador de los aceites sobre la absorción a nivel intramuscular.

Si se observan las curvas de concentraciones plasmáticas respecto al tiempo (fig. 2 a fig. 32), se puede apreciar un largo intervalo de tiempo (más de 10 horas) en el que los niveles plasmáticos de OTC se mantienen similares, entorno a 6 µg/ml. Un perfil similar fue obtenido por Archimbault y cols. (1989), Davey y cols. (1985) y Fourtillan y cols. (1989). Estos autores observaron, utilizando formulaciones retardadas, unos niveles algo más bajos que los obtenidos en los animales del presente estudio ya que administraron una dosis de 20 mg/kg, inferior a la utilizada aquí (30 mg/kg).

Por tanto queda reflejado que el perfil cinético de estos productos responde a un proceso de absorción lenta y continuada desde el punto de inyección en el músculo y se ajusta al de las formulaciones retardadas también encontrado por otros autores (Toutain y Raynaud, 1983; Davey y cols., 1985; El korchi y cols., 2001). Además, estos resultados encontrados sugieren que, una parte del fármaco administrado se queda retenido en el punto de inyección durante un largo periodo de tiempo, hipótesis que queda confirmada por los resultados obtenidos en el estudio de residuos también realizado, en el que a los 42 días postadministración de la especialidad, aún se detectan niveles elevados en el músculo procedente del punto de inyección. Esta retención del fármaco en el punto de inyección puede ser debida al vehículo utilizado (solución oleosa) y/o a las características irritantes de éste vehículo, así como al propio fármaco (Sun y cols., 2002).

Cuando se administró la misma dosis que la ensayada a cerdos, de entre 20-30 kg de peso, los resultados mostraron una C_{max} de 6.7 µg/ml a los 90 min (Hall y cols., 1989), siendo estos valores de un orden similar, aunque con ligeras diferencias que pueden estar correlacionadas con la variabilidad esperable entre especies respecto a los parámetros C_{max} y T_{max} .

Respecto a la eliminación del fármaco, la administración i.v. de la OTC a terneros en formulaciones acuosas muestra, que ésta se elimina del organismo con un $t_{1/2\beta}$ entorno a 7 horas (Kumar y Malik, 1998). Asimismo, cuando se administra a vacas y ovejas por vía i.v. se observa un $t_{1/2\beta}$ entre 3 y 7 horas (Ziv y Sulman, 1974; Meijer y cols., 1993; Moreno y cols., 1998; Rule y cols., 2001; Sun y cols., 2002), detectándose también ligeras diferencias en función de la edad y de la especie animal.

Otros estudios en los que se evaluaron formulaciones de oxitetraciclina retardadas o de liberación lenta, mostraron que los $t_{1/2\beta}$ del fármaco eran significativamente largos y que la administración del antibiótico vía i.m. presentaba un $t_{1/2\beta}$ tres o cuatro veces superior al observado cuando el fármaco se administraba en formulación acuosa (Davey y cols., 1985; Fourtillan y cols., 1989; Kumar y Malik, 1998). Esta elevada semivida de eliminación se justificaba por la acumulación del fármaco en el lugar de la administración, y algunos de estos autores observaron una significativa irritación en el punto de inyección (Nouws y Vree, 1983; Xia y cols., 1983; Terhune y Upson, 1989).

Si se analizan los valores obtenidos en nuestro estudio correspondientes al $t_{1/2\beta}$ y al MRT para cada una de las formulaciones ensayadas, se puede constatar que éstos son significativamente altos, entorno a las de 100 h. Resultados similares han sido obtenidos por Meijer y cols. (1993) cuando administraron por vía i.m. una dosis de 20 mg/kg en forma retardada. Estos valores fueron superiores a los resultados obtenidos por otros autores (Davey y cols., 1985; Fourtillan y cols., 1989; Archimbault y cols., 1994; Craigmill y cols., 2000).

También, si se tienen en cuenta los estudios en otras especies, se puede observar que los $t_{1/2\beta}$ observados en ovejas (Moreno y cols., 1998), en cerdos (Nielsen y Gyrd-Hansen, 1996; El korchí y cols., 2001), en vacas (Bretzlaff y cols., 1982; Bretzlaff y cols., 1983) y en cabras (Rule y cols., 2001) son significativamente inferiores a los obtenidos en el presente trabajo.

Las diferencias entre los estudios citados y el presente trabajo sugieren, que además de la influencia que puede ejercer el tipo de formulación utilizada, provocando un alargamiento del MRT y del $t_{1/2\beta}$, como consecuencia del enlentecimiento de la absorción, estas diferencias también pueden estar relacionadas con los tiempos de muestreo efectuados. En la mayor parte de estos trabajos se han tomado muestras a intervalos que no superan las 96 h, característica que provocaría que no se observe correctamente la fase final de eliminación. En este estudio, se han puesto de relieve unas curvas de niveles plasmáticos con una fase terminal asintótica, que a partir de los tres días postadministración y durante los 10 días de muestreo se mantiene en niveles similares. Este fenómeno podría ser consecuencia de la lenta absorción de la oxitetraciclina desde el punto de inyección. Además, este comportamiento es típico de

las cinéticas “flip-flop”, que son aquellas en las que la velocidad de absorción es igual a la de eliminación (Perrier y Gibaldi, 1982).

En general, los estudios realizados por vía i.m. muestran semividas biológicas significativamente más largas que las observadas cuando el fármaco se administra por vía i.v., sugiriendo ello de nuevo que en el lugar de inyección se produce un efecto reservorio, retardándose la absorción de la OTC y repercutiendo sobre el proceso de eliminación (Ziv y Sulman, 1974; Meijer y cols., 1993).

La lenta fase terminal observada ($t_{1/2\beta} = 114.7$ h) puede ser también resultado de la amplia distribución de la oxitetraciclina hacia los tejidos, tanto los bien irrigados como los periféricos, quedando en parte retenida en ellos. Esta amplia distribución estaría justificada por la elevada liposolubilidad del fármaco. No obstante, la fase terminal asintótica que se observa tras la administración i.m. de una formulación retardada, podría no detectarse tras la administración i.v. ya que los niveles plasmáticos en esta fase serían tan bajos que impedirían una correcta detección cromatográfica.

Diferentes autores también analizaron en bovinos la cinética de una formulación retardada de OTC y en este caso el perfil de las curvas de niveles plasmáticos observado fue también similar al del presente trabajo, aunque, como ya se ha indicado anteriormente, para el cálculo del $t_{1/2\beta}$, los resultados difirieron entre el presente estudio y los de estos autores.

En cerdos, Hall y cols. (1989) y El korchí y cols. (2001) y en caprinos Escudero y cols. (1994) observaron, tras la realización del tratamiento con formulaciones retardadas de OTC, un perfil equivalente al obtenido en los terneros objeto de este estudio.

En cuanto al AUC, algunos autores obtuvieron en terneras, al administrar una dosis de 20 mg/kg, unos valores de alrededor de 210 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, habiéndose realizado un muestreo similar al de este trabajo (Fourtillan y cols., 1989; Kumar y Malik, 1998, 1999; Craigmill y cols., 2000). En Otros trabajos publicados se observaron al administrar la misma dosis, un AUC entre 253- 273 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ (Archimbault y cols., 1989; Clarke y cols., 1999) y tras la administración de una dosis doble, un valor de AUC de 462 ± 89 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ (Terhune y Upson, 1989). En el estudio que se ha llevado a cabo, en el que la dosis administrada fue de 30 mg/kg, las AUC fueron de 317.7 ± 79.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ y

263.6 ± 81.4 µg.h/ml, según la formulación, valores ligeramente superiores a los obtenidos al administrar la dosis de 20 mg/kg e inferiores a los de 40 mg/kg, elemento que sugiere que el fármaco presenta una cinética lineal a las concentraciones ensayadas.

Al comparar el AUC en cabras, estos valores, a la dosis de 20 mg/kg, fueron inferiores, del orden del 64.4-126.75 µg.h/ml (Escudero y cols., 1994; Escudero y cols., 1996; Rule y cols., 2001; Payne y cols., 2002) y en ovejas el AUC aumentó, siendo el valor de 209 ± 43 µg.h/ml (Craigmill y cols., 2000). Otros estudios realizados en cerdos mostraron que el AUC variaba entre 100 µg.h/ml y 355 µg.h/ml en función de la dosis administrada, siendo este último valor el correspondiente a la dosis de 30 mg/kg. La administración de una dosis de 10 mg/kg por vía i.v. a cerdos, muestra un AUC del orden de 43.4 µg.h/ml (Hall y cols., 1989; Pijpers y cols., 1990; Banting y Baggot, 1996; Nielsen y Gyrd-Hansen, 1996; El korchí y cols., 2001) y en caballos se obtuvieron valores de 223.7 µg.h/ml (Horspool y Mckellar, 1990).

Si se evalúa el AUC obtenido en el presente estudio durante los diferentes periodos de muestreo, el análisis muestra que a los 3 días de haber administrado la formulación, el área representa un 58% del AUC_{0[∞]}. A los 9 días, este valor ya es de un 82%, indicando ello la alta biodisponibilidad que presenta la especialidad y confirmándose este hecho con los niveles encontrados en el punto de inyección a los 28 días, donde la concentración presente de fármaco en este punto suponía valores tan solo de entre el 1.9% y el 0.00006% de la dosis administrada.

V.1.2. Análisis de la bioequivalencia

Los resultados obtenidos del cálculo de los intervalos de confianza del 90%, cuando se comparan los parámetros farmacocinéticos evaluados (AUC, C_{max} y T_{max}), resultantes del análisis de las curvas de concentraciones plasmáticas de OTC respecto al tiempo y obtenidas tras la administración intramuscular a terneros de la dosis terapéutica recomendada (30 mg/kg), mostraron para el AUC y la C_{max} un rango entre el 80 y el 125%, considerado como adecuado por la guía para la evaluación de estudios de la bioequivalencia entre especialidades veterinarias EMEA/CVMP/016/00. En el caso de T_{max} el intervalo encontrado estuvo entre 66.7 y 141.4 %. La guía remarca que para este parámetro, la interpretación del valor obtenido del intervalo de confianza depende del valor del T_{max}. No obstante, este intervalo no debería interpretarse como una falta de

bioequivalencia debido a las características de las formulaciones utilizadas en este estudio, las cuales proporcionan concentraciones similares durante casi 12 horas y probablemente, si se hubiera utilizado un número mayor de animales las diferencias entre los valores del T_{max} no hubieran sido significativas.

De acuerdo con las directivas establecidas por la FDA y el CVMP (EMEA/CVMP/016/00), estos resultados sugieren que las formulaciones ensayadas son bioequivalentes.

V.1.3. Eficacia terapéutica

Para evaluar la eficacia de la OTC se debe tener en cuenta que este fármaco se clasifica, según algunos autores, dentro del grupo de antibióticos tiempo dependiente y con efecto postantibiótico (Craig, 2003). Esto significa que son antibacterianos con una efectividad residual cuando las concentraciones del fármaco están por debajo del CMI_{90} . Por tanto, no es necesario que estas concentraciones estén por encima de la CMI_{90} de forma constante, sino que pueden quedar por debajo de éste valor durante cortos intervalos de tiempo, lo que implicaría que la cobertura terapéutica estaría garantizada por el efecto postantibiótico. Este tipo de fármacos inhiben la síntesis proteica actuando en la fase de crecimiento/multiplicación de las bacterias, razón por la que un corto espacio de tiempo sin concentraciones efectivas no permitirá un crecimiento significativo del número de células bacterianas presentes. Esta característica de algunos antibacterianos permite que los fármacos de este grupo puedan ser administrados en intervalos de dosificación más espaciados conservando la efectividad.

No obstante, otros autores sitúan la OTC como fármaco concentración dependiente baja (Van Bambeke y Tulkens, 2001), aunque los diferentes autores coinciden en que uno de los parámetros que mejor define la efectividad de este tipo de drogas es la relación AUC_{24h}/CMI_{90} , ya que este parámetro evalúa, en un intervalo de 24 h, la relación de las concentraciones plasmáticas con la eficacia antibacteriana (Van Bambeke y Tulkens, 2001; Craig, 2002).

Según Gunderson y cols. (2001) los valores de AUC_{24h}/CMI_{90} deben ser superiores a 125. No obstante, estos valores se obtienen de experimentos realizados con animales inmunodeprimidos, proponiéndose por otros autores valores adecuadas aquellos que se

sitúan entre 25 y 30 cuando se utilizan animales con un estado inmunitario normal (Jacobs, 1999, 2001; Craig, 2003). En el presente estudio, los animales utilizados estaban sanos y presentaban un estado inmunitario normal, razón por la que se podría considerar mas adecuado tomar como referencia valores de AUC_{24h}/CMI_{90} superiores a 25-30.

Si se tiene en consideración el valor de AUC_{24h}/CMI_{90} propuesto por Jacobs (2001) y Craig (2003) de 25-30, éste estaría, para cada una de las formulaciones estudiadas, por encima de este valor para microorganismos como *Micoplasma hypneumoniae*, *Ureaplasma spp* y *Moraxella boris*. Si se tiene en cuenta la CMI_{50} , el parámetro AUC_{24h}/CMI_{50} se encontraría en un intervalo que permitiría sugerir que la OTC sería eficaz frente a los microorganismos escogidos y de acuerdo con las tablas 16 y 17. En cambio, si se considera el valor de 125 propuesto por (Gundersen y cols., 2001), tan sólo sería eficaz el tratamiento frente a *Ureaplasma spp*, tanto para las CMI_{90} como para CMI_{50} .

Si se evalúa el parámetro $T_{max}/CMI \geq 50\%$, propuesto por Gundersen y cols. (2001) este índice sería eficaz solamente para *Micoplasma hypneumoniae* y *Arcanobacterium pyogen* en el caso de CMI_{50} y para *Ureaplasma spp* en el caso de CMI_{90} .

Las concentraciones plasmáticas encontradas en este estudio, tras la administración de una dosis de 30 mg/kg por vía i.m., son bastantes altas y se mantienen alrededor de 7 $\mu\text{g/ml}$ durante mas de 10 horas, siendo estos valores, a los 3 días postadministración, del orden de 0.7 $\mu\text{g/ml}$. Al evaluar estas concentraciones se observa que son ligeramente superiores a las CMI_{90} de los principales microorganismos causantes de las infecciones que con más frecuencia afectan a terneros.

Si a partir de la C_{max} , se evalúa el correspondiente índice de eficacia C_{max}/CMI_{90} puede observarse que si se tienen en cuenta las CMI_{50} , todos los microorganismos estudiados serían sensibles a la oxitetraciclina cuando ésta se administra a una dosis de 30 mg/kg. En cambio, en el caso de las CMI_{90} , solamente para *Micoplasma hyopneumoniae* y *Moraxella* se cumplen los criterios establecidos por Sanchez (2000), Gundersen y cols. (2001) y Craig (2003), ya que el índice C_{max}/CMI_{90} alcanzaría valores cercanos o superiores a 10. Consecuentemente, el uso de este antibiótico podría ser de utilidad en el tratamiento de infecciones respiratorias, renales o articulares.

Diferentes autores han evaluado las concentraciones de OTC en tejidos como el pulmón, encontrando valores de $4.7 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ y $2.3 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ a las 12 y 48 h postadministración, respectivamente y tras administrar una formulación retardada de OTC a una dosis de 40 mg/kg por vía i.m. (Terhune y Upson, 1989). Asimismo, Ames y cols. (1985) evaluaron la diferencia entre las concentraciones pulmonares de terneros sanos y de terneros con neumonía, observando que éstas no diferían en función de si el animal tratado estaba sano o enfermo y encontrándose estos niveles entre 1.72 y 0.43 $\mu\text{g/g}$, a las 24 y 48 h, respectivamente de haber administrado el fármaco.

Estos resultados mostrarían que las concentraciones de OTC presentes en el pulmón, a las 24 y 48 h del tratamiento, según las especificaciones terapéuticas de las formulaciones utilizadas por estos autores, superarían de forma notable las CMI₉₀ y CMI₅₀ de los principales microorganismos implicados en infecciones respiratorias de terneros.

A partir de la evaluación de las concentraciones plasmáticas y pulmonares obtenidas por estos autores, se observa que la relación entre los niveles en el pulmón y el plasma es de aproximadamente 1:2, respectivamente. Por lo tanto, si se aplica esta misma relación a las formulaciones A y B ensayadas se podrían evaluar las concentraciones que se encontrarían en el pulmón de los animales tratados, utilizando para ello los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo. Para la formulación A, la concentración en el pulmón oscilaría entre 4.7 y 0.25 $\mu\text{g/g}$ y para la formulación B, los niveles estarían entre 4.45 y 0.15 $\mu\text{g/g}$. De nuevo, si se relacionan estos valores con las CMI₅₀ y CMI₉₀ para los microorganismos relacionados en la tabla 15 y tabla 18, se puede observar que, en el caso de la CMI₅₀, la concentración en el pulmón sería superior durante un tiempo de hasta 120 h para *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Arcanobacterium pyogene*. Este periodo se reduciría hasta 72 h para *Mycoplasma agalactiae* y hasta 24 h para el resto de los microorganismos evaluados.

En el caso de la CMI₉₀ el intervalo en el que las concentraciones se encontrarían por encima de este valor se reduce de forma considerable. Los animales estarían cubiertos por el fármaco tan sólo durante 4 h frente a *Leptospira spp* y únicamente estarían cubiertos frente a *Mycoplasma agalactiae* durante un intervalo de 48 h tras la

administración de la formulación A y de 36 h tras la administración de la formulación B.

En conclusión, estos resultados indicarían que la pauta terapéutica a seguir variaría de forma considerable en función del microorganismo frente al cual se pretende actuar, puesto que una misma pauta sería eficaz frente a un microorganismo pero no frente a otro.

En general, si se tienen en cuenta, tanto las concentraciones que se presentarían en pulmón, como los valores propuestos por Craig y cols. (2003) para el AUC_{24h}/CMI_{90} de 25-30, para $C_{max}/CMI_{90} > 10$ y para $T_{max}/CMI \geq 50\%$, la evaluación de la eficacia de OTC tras administrar las formulaciones A y B ensayadas y a partir de los datos de CMI_{50} y CMI_{90} recogidos en la bibliografía, permitiría concluir que las infecciones respiratorias causadas por *Mycoplasma* y otras enfermedades como la queratoconjuntivitis provocada por *Moraxella bovis*, se podrían resolver con un dosis entre 20 y 40 mg/kg de OTC.

Datos muy recientes observados en cerdos por la red de vigilancia de resistencias antimicrobianas española (Laboratorio de Vigilancia Sanitaria, 2005) ponen de relieve el alto nivel de resistencias que actualmente algunos gérmenes patógenos respiratorios porcinos han desarrollado en España (superior al 66% y con $CMI_{90} > 32$ para algunos de ellos) en particular frente a tetraciclina y oxitetraciclina. Estos datos sugieren que para hacer una evaluación ajustada de la eficacia sería necesario hacer un amplio estudio de los CMI_{50} y CMI_{90} para los gérmenes que más frecuentemente son responsables de las infecciones respiratorias en bovino, ya que el uso abusivo de estos antimicrobianos está provocando un incremento significativo de los niveles de resistencia a los antimicrobianos y por tanto cambiando el perfil de eficacia de estos fármacos.

V.2. ESTUDIO DE RESIDUOS DE OTC+4-EPIOTC EN TERNERAS

V.2.1. Estudio de residuos de OTC+4-epiOTC en terneras

Según se recoge en el *Summary Report* (EMEA/MRL/023/95), la OTC se distribuye extensamente por todos los tejidos corporales, alcanzando niveles altos en el hígado, riñón, huesos y en los dientes.

Tras realizar el estudio de residuos, los resultados obtenidos muestran que a los 28 días postadministración las concentraciones de OTC + 4-Epi OTC, en la mayoría de los animales tratados, están muy por encima del LMR y aunque se aprecia un descenso en las concentraciones observadas a lo largo del tiempo, éstas continúan por encima de este valor en los animales sacrificados a los 42 días posteriores al día en que se efectuó el tratamiento.

Este resultado pone de manifiesto el comportamiento que presenta las formulaciones utilizadas en este estudio, las cuales al ser oleosas actúan como formas retardadas. Se observa que, una vez administrada la especialidad por vía i.m. la velocidad de absorción desde el punto de inyección es significativamente lenta, como ya se ha destacado en el análisis de los parámetros cinéticos plasmáticos. La concentración tisular encontrada en los animales sacrificados a los 42 días postratamiento supone entre un 0.012% y 0.003% de la cantidad total del fármaco administrado, calculado siempre sobre 500 g de músculo (muestra de tejido obtenida en el punto de inyección) (EMEA/CVMP/542/03/final, 2004). Esto sugiere, que aunque lentamente, el fármaco se absorbe en su totalidad.

Mawhinney y cols. (1996), en un estudio realizado en terneras, tras administrar OTC por vía i.m. a dosis única, encontraron niveles por encima del LMR en el punto de inyección hasta los 30 días posteriores a la administración del fármaco, siendo las concentraciones inferiores a este valor a los 45 días post-administración. Estos mismos autores, tras realizar un estudio con OTC, administrada a dosis múltiple en sitios diferentes, observaron que los residuos en los tejidos analizados eran mucho más bajos que los encontrados tras la administración a dosis única. Otros autores, tras administrar 20 mg/kg, encontraron niveles por debajo del LMR en el punto de inyección a los 20 días postadministración (Landoni y Errecalde, 1992). Estos datos sugieren que la

absorción del fármaco desde el punto de inyección podría ser dosis dependiente, es decir que se vería influida por la dosis administrada. En cabras, los niveles del punto de inyección a los 14 días de la administración de una dosis de 20 mg/kg fueron del orden de 1.54 µg/g (Payne y cols., 2002) y en ovejas se encontraron niveles por encima de LMR hasta los 7 días posteriores al tratamiento, no detectaron niveles por encima de este valor a los 14 días (Craigmill y cols., 2000). Esto podría estar relacionado con las diferencias anatómicas y fisiológicas que se observan entre especies.

Las concentraciones de OTC a nivel hepático y renal observadas en los animales objeto de este estudio y sacrificados a diferentes tiempos, fueron similares entre sí en cada uno de los periodos de sacrificio realizados, observándose una muy lenta depleción en el intervalo de tiempo analizado. Para poder evaluar la eliminación en estos tejidos, los tiempos de sacrificio deberían haber estado más distanciados y haberse realizado los primeros sacrificios más tempranamente. Esto sugiere, que la estimación de los tiempos de muestreo no fueron los más adecuados para evaluar el tiempo de espera para este tipo de formulaciones.

En un estudio realizado en ovejas a las que se les administró por vía i.m. una dosis de 5 mg/kg de oxitetraciclina y posteriormente fueron sacrificadas a las 5 horas postratamiento, se observaron en el riñón concentraciones de 14.9 µg/g, en hígado 3.7 µg/g y en músculo 1.6 µg/g. Después de 24 h del tratamiento, en el músculo se observaron niveles superiores a 0.5 µg/g, en el hígado superior a 1 µg/g y en el riñón (cortex) superiores a los 6 µg/g (Farrington y cols., 1991). En cambio, en otro estudio realizado en ovejas a las que se les administró por vía i.m. una dosis de 20 mg/kg de OTC y donde los animales fueron sacrificados a 1, 2, 3, 5, 7 y 14 días postadministración del fármaco, se detectaron niveles de OTC por debajo del LMR en el músculo, hígado y riñón a las 48 horas postadministración (Craigmill y cols., 2000). Resultados similares fueron también observados en el estudio realizado por Nouws y cols. (1990) en esta misma especie. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con las dosis administradas y con el tipo de formulación, la cual no viene referida en los artículos publicados.

Diferentes estudios realizados en leche mostraron que tras la administración de una dosis de 20 mg/kg por vía i.m. a vacas, los niveles fueron del orden de 0.155 ± 0.007

$\mu\text{g/g}$ a las 120 h (Payne y cols., 2002). En cabras, estos mismos autores encontraron concentraciones del orden de $0.028 \pm 0.017 \mu\text{g/g}$. En cambio, Reja y cols. (1994) presentaron en su trabajo niveles entorno a $0.459 \mu\text{g/g}$ tras la administración de una dosis de 15 mg/kg y después del tratamiento mediante infusión intrauterina a vacas lactantes con 2 g de OTC. En el primer ordeño se determinaron concentraciones de $0.186\text{-}0.192 \mu\text{g/g}$ del antibiótico y después del octavo ordeño (96 h) la leche contenía menos de 30 ng/g (Anderson y cols., 1995). Roncada y cols. (2000) al administrar una dosis de 3 g por esta misma vía detectaron niveles del orden de $0.066 \mu\text{g/g}$ en la leche a las 72 horas y a las 96 horas ya no aparecían concentraciones en esta matriz, indicando ello la baja absorción desde este lugar de administración y la reducida acumulación del fármaco en esta matriz.

En un estudio realizado también en cabras, a las que se administró por vía i.v. e i.m. una dosis de 20 mg/kg de dos formulaciones de OTC, una convencional y una formulación de larga acción, los autores encontraron niveles en leche hasta 48 y 72 h de finalizar el tratamiento con la formulación convencional y de larga acción, respectivamente (Rule y cols., 2001).

Estos estudios demuestran que la OTC es capaz de alcanzar la glándula mamaria después de su administración por vía i.v. o i.m., mostrando su amplia distribución hasta los tejidos periféricos y como ya han sugerido los estudios del perfil farmacocinético, influyendo este hecho de forma significativa en su eliminación.

En conclusión, los estudios de residuos llevados a cabo con diferentes formulaciones, dosis y diferentes especies demuestran la clara influencia que estos factores tienen en la acumulación del fármaco en los diferentes tejidos tanto centrales como periféricos.

V.2.2. Tiempo de espera

Si se siguen las recomendaciones de la guía EMEA/CVMP/036/95 FINAL 96 para determinar el tiempo de espera de una especialidad, para su aplicación en este estudio, las concentraciones encontradas en los diferentes tejidos y en los diferentes periodos de sacrificio no permiten realizar el cálculo estadístico recomendado en la guía, ya que los niveles presentes en los tejidos no muestran una depleción clara y no se cumplen las diferentes premisas fijadas para proceder a este cálculo.

La guía también propone una alternativa a este cálculo estadístico y es la aplicación de un margen de seguridad entre el 10-30 % sobre el primer periodo de sacrificio en el que las concentraciones encontradas en todos los tejidos están por debajo del LMR. La aplicación de este criterio es posible en tejidos como el hígado y el riñón, donde tras aplicar el 30% de margen de seguridad sobre los tiempos de sacrificio en los que las concentraciones estuvieron por debajo del LMR (35 días en el riñón y 42 días en el hígado) se obtendría un tiempo de espera de 45.5 días para el riñón y 54.6 días para el hígado. No obstante, si se consideran las concentraciones en el músculo del *longissimus dorsi* y del punto de inyección (tablas del cuello), este criterio no puede ser aplicado debido a que en alguno de los animales tratados se observaron, en estos tejidos, concentraciones del fármaco por encima del LMR en el último tiempo de sacrificio realizado (42 días).

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que, para poder determinar un tiempo de espera seguro para una especialidad de las características de la administrada, según pauta y dosis recomendadas, sería necesario fijar tiempos de sacrificio posteriores a los 42 días post-tratamiento, puesto que en este tiempo las concentraciones en el músculo aún se encuentran por encima del LMR. Además, sería adecuado aumentar el número de animales ya que la variabilidad obtenida debido a la aplicación formulaciones retardadas es bastante elevada y no permite obtener resultados orientativos sobre el tiempo de espera que podría resultar más apropiado.

Destacar que estos resultados estarían de acuerdo con las características de las formulaciones retardadas de administración i.m., las cuales provocan una alta variabilidad en el proceso de absorción que repercutiría de forma directa sobre la distribución tisular y la eliminación del fármaco y por tanto sobre la evaluación de los parámetros cinéticos. Además, la OTC es un fármaco muy liposoluble que alcanza los tejidos muy periféricos pudiendo quedar retenido en alguno de ellos, factor que también puede afectar a la eliminación y que puede contribuir a una elevada variabilidad en los resultados.

VI. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones máximas obtenidas tras la administración i.m. de dos formulaciones comerciales (A y B) que contenían como principio activo oxitetraciclina al 30%, a una dosis de 30 mg/kg, fueron de $10.1 \pm 4.1 \mu\text{g/ml}$ y $9.5 \pm 4.5 \mu\text{g/ml}$ para las formulaciones A y B, respectivamente y se presentaron alrededor de las 3 horas postadministración. A partir de este momento las concentraciones plasmáticas se mantuvieron similares durante un intervalo de más de 10 horas postadministración, encontrándose niveles medios detectables de $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ hasta 10 días después de haber realizado el tratamiento.
2. Tras la administración de esta misma dosis a terneros, el $\text{AUC}_0^{3\text{días}}$ obtenida fue de $181.2 \pm 36.9 \mu\text{g.h/ml}$ y $167.3 \pm 31.7 \mu\text{g.h/ml}$ y el $\text{AUC}_0^{10\text{días}}$ de $257.3 \pm 52.1 \mu\text{g.h/ml}$ y $234.9 \pm 54.9 \mu\text{g.h/ml}$ para las formulaciones A y B, respectivamente.
3. Los valores del $t_{1/2\beta}$ y el MRT obtenidos después de la administración de las dos especialidades ensayadas fueron significativamente altos, ajustándose el perfil cinético a un proceso de absorción lento y continuado desde el punto de inyección y a una eliminación condicionada por esta absorción, respondiendo este comportamiento al de las cinéticas “flip-flop”.
4. Los perfiles de las curvas de niveles plasmáticos de las dos formulaciones estudiadas, así como los parámetros cinéticos obtenidos, ponen de relieve el carácter “retardado” de ambos productos, resultado de los excipientes oleosos en los que la OTC se encontraba disuelta.
5. El análisis estadístico de la equivalencia realizado a partir de los perfiles cinéticos de ambas formulaciones de acuerdo con la guía de EMEA/CVMP/016/00 puso de relieve la bioequivalencia de las dos formulaciones ensayadas.
6. Las concentraciones plasmáticas encontradas en el punto de inyección de los animales sacrificados a los 28 y 42 días del tratamiento presentaron valores entre 0.0006% y 1.9% respecto a la dosis total administrada, sugiriendo este porcentaje, que aunque de forma lenta, el fármaco se absorbe en su totalidad.
7. El análisis pK-pD realizado para demostrar la eficacia terapéutica del tratamiento llevado a cabo con las especialidades de OTC y que relaciona las

C_{max} , las AUC_{0-24h} y el tiempo en que las concentraciones están por encima de la CMI con las CMI_{50} y las CMI_{90} , permite concluir que las infecciones causadas por *Mycoplasma* y otras enfermedades como la queratoconjuntivitis provocada por *Moraxella bovis*, se podrían resolver con la dosis terapéutica recomendada de 30 mg/kg p.v. por vía i.m. a dosis única.

8. A partir de datos publicados, se observa que la relación entre las concentraciones plasmáticas y pulmonares de oxitetraciclina es de 1:2, lo cual permite establecer, a partir de los niveles de OTC observados en el plasma de los animales tratados en este estudio, unos niveles en el pulmón que oscilarían entre 4.7 $\mu\text{g/g}$ y 0.25 $\mu\text{g/g}$, para la formulación A y entre 4.45 $\mu\text{g/g}$ y 0.15 $\mu\text{g/g}$, para la formulación B. Estos resultados confirmarían de nuevo la eficacia del tratamiento recomendado frente a *Mycoplasma* y *Moraxella bovis*, ya que estos valores están muy por encima de la CMI_{50} y la CMI_{90} .
9. El estudio de residuos realizado en terneros a los que se administró la especialidad A, según la dosis y pauta terapéuticas recomendadas de 30 mg/kg p.v. en dosis única mostró que:
 - De acuerdo con la guía CVMP/EMEA/036/95 FINAL, la aplicación de un margen de seguridad del 30% a tejidos como hígado y riñón y al tiempo de sacrificio en el que las concentraciones se encontraban por debajo del LMR dió como resultado un tiempo de espera de 45.5 días, si se utilizaba como tejido marcador el riñón y de 54.6 días si el tejido evaluado era el hígado.
 - No se pudo aplicar este mismo criterio en el músculo de *longuissimus dorsi* ni en el punto de inyección, debido a que en el último tiempo de sacrificio realizado (42 días), aún se observaron concentraciones por encima del LMR. Estos datos sugieren la necesidad de fijar tiempos de sacrificio superiores a los ensayados en este estudio para así poder evaluar el tiempo de espera que será seguro para el consumidor después de administrar estas especialidades bajo las condiciones ensayadas en los animales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adawa, D. A. Y., Hassan, A. Z., Abdullah, S. U., Ogunkoya, A. B., Adeyanju, J. B., y Okoro, J. E. (1992) "Clinical trial long acting oxytetracycline and piroxicam in the treatment of canine ehrlichiosis" *Vet. Quarterly*. **14**, (3), 118-120.
- Ames, T., Larson, V., y Stowe, C. (1983) "Oxytetracycline concentrations in healthy and diseased calves" *Am. J. Vet. Res.* **44**, (7), 1354 -57.
- Ames, T. R., y Patterson, E. B. (1985) "Oxytetracycline concentrations in plasma and lung of healthy and pneumonic calves, using two oxytetracycline preparations" *Am. J. Vet. Res.* **46**, (12), 247-473.
- Anderson, K. L., Moats, W. A., Rushing, J. E., Wesen, D. P., y Papich, M. G. (1995) "Potential for oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and High-performance liquid chromatography test methods" *Am. J. Vet. Res.* **56**, 70 - 77.
- Anika, S. M., Nouws, J. F. M., Van Gogh, H., Nieuwen, H. J., Vree, T. B., y Van Miert, A. S. P. M. (1986) "Chemotherapy and pharmacokinetics of some antimicrobial agents in healthy dwarf goats and those infected with *Ehrlichia phagocytophila* (tick borne fever)" *Res. Vet. Sci.* **41**, 386-390.
- Aoyama, R. G., McErlane, K. M., y Erber, H. (1991) "High- performance liquid chromatography analysis of oxytetracycline in chinook salmon following administration of medicated feed" *J. Chromatogr.* **588**, 181-186.
- Appleyard, W. T., y Gilmour, N. J. L. (1990) "Use of long-acting of oxytetracycline against pasteurellosis in lambs" *Vet. Rec.* 126, 231.
- Archimbault, P., Ambrogi, G., y Wac-kowicz, G. (1989) "Biodisponibilidad plasmática comparativa de dos formulaciones a base de oxitetraciclina 20% L.A" *Med.Vet.* **6**, (3), 165-168.
- Archimbault, P., Navetat, H., Vidal, R., Douin, M. J., y Mignot, A. (1994) "Plasma bioavailability of two long-acting oxytetracycline formulations in the pig" *Vet. Res.* **25**, 399-404.

- Aronson, A. L. (1980) "Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**, 1061-1068.
- Azanza, J. R., Honorato, J., y Mediavilla, A. (1997) "Tetraciclinas, Cloranfenicol y otros antibióticos" en: *Farmacología Humana* (J. M. S. A. Florez, ed.), Barcelona, pp. 1131-.
- Ball, J. H., y Campbell, J. N. (1989) "Antibiotic treatment of experimental *Mycoplasma californicum* mastitis" *Vet. Rec.* 125-377.
- Banting, A. D., Duval, M., y Gregoire, S. (1985) "A comparative study of serum kinetics of oxytetracycline in pigs and calves following intramuscular administration" *J.Vet. Pharmacol.Ther.* **8**, 418-420.
- Banting, A. L., y Baggot, J. D. (1996) "Comparison of the pharmacokinetics and local tolerance of three injectable oxytetracycline formulations to pigs" *J. Vet. Pharmacol.Ther.* **19**, 50-55.
- Barrigon, S., Montañes, P., y Lorenzo, P. (1993) "Tetraciclinas y cloranfenicol, Macrolides, otros antibióticos", en: *Velázquez. Farmacología* (M.-H.-I. D. ESPAÑA, ed.), Madrid, pp. 977-997.
- Barza, M., Brown, R. B., Shanks, C., Gamble, C., y Weinstein, L. (1975) "Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, oxytetracycline in dogs" *Antimicrob. Agents. Chemother.* **8**, 713-720.
- Baxter, P., y McKellar, Q. (1995) "Plasma and lung concentrations of oxytetracycline after its intramuscular administration in rats" *Lab. Anim. Sci.* **45**, (1), 107-109.
- Baxter, P., y McKellar, Q. A. (1990) "Distribution of oxytetracycline in normal and diseased ovine lung tissues" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **13**, 428-431.
- Bentley, O. E. (1983) "Comparative efficacy of neomycin and oxytetracycline alone and in combination against concurrent salmonellosis and pasteurellosis in swine" *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician, March.* 409-414.

- Boatto, G., Pau, A., Palomba, M., Arenare, L., y Cerri, R. (1999) "Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography" *J. Pharma. Biomed. Anal.* **20**, (1-2), 321-326.
- Bodley, J. W., y Zieve, F. J. (1969) "On the specificity of the two ribosomal binding sites: studies with tetracycline" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, (3), 463-468.
- Bossuyt, R., Van Renterghem, R., y Waes, G. (1976) "Identification of antibiotic residues in milk by Thin-layer chromatography" *J. Chromatogr.* **124**, (1), 37 - 42.
- Bretzlaff, K. N., Ott, R. S., Koritz, G. D., Lock, T. F., Bevill, R. F., Gustafsson, B. K., y Davis, L. E. (1983) "Distribution of oxytetracycline in genital tract tissues of postpartum cows given the drug by intravenous and intrauterine routes" *Am. J. Vet. Res.* **44**, (5), 764-769.
- Bretzlaff, K. N., Ott, R. S., Koritz, G. D., Lock, T. F., Bevill, R. F., Shawley, R. V., Gustafsson, B. K., y Davis, L. E. (1982) "Distribution of oxytetracycline in the genital tract of cows" *Am. J. Vet. Res.* **43**, (1), 12-16.
- Burrows, G. E., Barto, P. B., y Martin, B. (1987) "Comparative pharmacokinetics of gentamicin, neyomicin and oxytetracycline in newborn calves" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **10**, (1), 54-63.
- Carson, M. C. (1993) "Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using metal chelate affinity chromatography" *J. AOAC int.* **76**, (2), 329-334.
- Clarke, C. R., Wang, Z., Cudd, L., Burrows, G. E., Kirkpatrick, J. G., y Brown, M. D. (1999) "Pharmacokinetics of two long-acting oxytetracycline products administered subcutaneously and intramuscularly" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **22**, (1), 65-77.

- Connamacher, R. H., y Mandel, H. G. (1965) "Binding of tetracycline to the 30 S ribosomes and to polyuridylic acid" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**, 98-103.
- Cooper, A. C., Fuller, J. R., Fuller, M. K., Whittlestone, P., y Wise, D. R. (1993) "In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance" *Res. Vet. Sci.* **54**, (3), 329-334.
- Craig, W. A. (2002) "The role of pharmacodynamics in effective treatment of community-acquired pathogens" *39th annual meeting of infectious diseases society of America.* **2**, (4), 126-134.
- Craig, W. A. (2003) "Appropriate use of antimicrobial agents: PK-PD approach" *Isaar.* 132-135.
- Craigmill, A. L., Holland, R. E., Robinson, D., Wetzlich, S., y Arndt, T. (2000) "Serum pharmacokinetics of oxytetracycline in sheep and calves and tissue residues in sheep following a single intramuscular injection of a long-acting preparation" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23**, (6), 345-352.
- Chappell, G. S., Houghlum, J. E., y Kelley, W. N. (1986) "Determination of oxytetracycline in premixes and veterinary products by liquid chromatography" *J. AOAC Int.* **69**, (1), 28-30.
- Chen, C. L., y Gu, X. (1995) "Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum, and urine by capillary electrophoresis" *J. AOAC Int.* **78**, (6), 1369-1377.
- Chow, A. W., Cheng, N., y Bartlett, K. (1985) "In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* to new beta-lactam and quinolone antibiotics." *Antimicrob. Agents. Chemother.* **28**, (6), 842-844.
- Dámaso, D. (1990) "Tetraciclinas. Antibacterianos" *Marketing Pharm, S.A., Madrid.* 331-337.
- Davey, L. A., Ferber, M. T., y Kaye, B. (1985) "Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and conventional oxytetracycline injection" *Vet. Rec.* **117**, (17), 426-429.

- Davidson, D. E., Dill, G. S., Tingpalapong, M., Premabutra, S., Nguen, P. L., Stephenson, E. H., y Ristic, M. (1978) "Prophylactic and therapeutic use of tetracycline during an epizootic of ehrlichiosis among military dog" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**, (6), 697-700.
- Day, L. E. (1966) "Tetracycline inhibition of cell-free protein synthesis. II. Effect of the binding of tetracycline to the components of the system" *J. Bacteriol.* **92**, (1), 197-203.
- De Leenheer, A. P., y Nelis, H. J. (1979) "Doxycycline determination in human serum and urine by High-performance liquid chromatography" *J. Pharm. Sci.* **68**, (8), 999-1002.
- De Wasch, K., Okerman, L., Courbels, S., De Brabander, H., Van Hoof, J., y De Baker, P. (1998) "Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken mest: correlation between results of screening and confirmatory tests" *Analyst.* **123**, (12), 2737-2741.
- Doern, G. V., Pfaller, M. A., Kugler, K., Freeman, J., y Jones, R. N. (1998) "Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America:1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program" *Clin. Infect. Dis.* **27**, (4), 764-770.
- El korch, G., Prats, C., Arboix, M., y Pérez, B. (2001) "Disposition of oxytetracycline in pigs after i.m. administration of two long-acting formulations" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **24**, (4), 247-250.
- Elsheikh, H. A., Osman, I. A., y Ali, B. H. (1997) "Comparative pharmacokinetics of ampicililin trihydrate, gentamicin sulphate and oxytetracycline hydrochloride in Nubian goats and desert sheep" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **20**, (4), 262-266.
- EMEA/CVMP/036/95 FINAL (1996) "Approach towards harmonisation of withdrawal periods".
- EMEA/MRL/023/95 (1995) "Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary report (1)".

- EMEA/MRL/023/95 (1995) "Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary report (2)".
- EMEA/MRL/023/95 (1995) "Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary report (3)".
- EMEA/CVMP/136312/2006 (2006) "Oxytetracycline. Summary Ópinion (Extension to honey bees)".
- EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL (2001) "Guidelines for de conduct of bioequivalence studies for veterinary medecinal products".
- EMEA/CVMP/542/03-FINAL (2003) "Injection site residues".
- EMEA (1998a) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Guideline on validation of analytical procedures: defintions and terminology. VICH Topic GL1. Londres.
- EMEA (1998b) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Guideline on validation of analytical procedures: Methodology. VICH Topic GL2. Londres.
- Ericsson, C. D., Feldman, S., Pickering, L. K., y Cleary, T. G. (1982) "Influence of subsalicylate bismuth on absorpion of doxycycline" *J. Am. Med. Assoc.* **247**, (16), 2266-2267.
- Escudero, E., Carceles, C. M., Ponferrada, C., y Baggot, J. D. (1996) "The pharmacokinetics of a long-acting formulation of oxytetracycline in sheep and goat" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **19**, (1), 75-77.
- Escudero, E., Carceles, C. M., y Serrano, J. M. (1994) "Pharmacokinetics of oxytetracycline in goats: modifications induced by a long-acting formulation" *Vet. Rec.* **135**, (23), 548-551.
- Farrier, D. S. (1997) "PKSolution 2.0. Noncompartmental data analysis" *Summit Research Services, Ashland, USA.*

- Farrington, W. H., Tarbin, J., Bygrave, J., y Shearer, G. (1991) "Analysis of trace residues of tetracycline in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography / HPLC" *Food. Addit. Contam.* **8**, (1), 55-64.
- Fey, G., Reiss, M., y Kersten, H. (1973) "Interaction of tetracycline with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. A fluorimetric investigation" *Biochemistry.* **12**, (6), 1160-1164.
- Fletouris, D. J., Psomas, J. E., y Botsoglou, N. A. (1990) "Trace analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by High-performance liquid chromatography" *J. Agric. Food. Chem.* **38**, 1913-1917.
- Fourtillan, J. B., Ingrand, I., y Moreau, J. (1989) "Biodisponibilités de l'oxytetracycline chez les bovins après administrations intramusculaires de deux formes à libération contrôlée" *Rec. Med. Vet.* **165**, (8-9), 727-731.
- Furusawa, N. (1999) "Rapid liquid chromatography determination of oxytetracycline in milk" *J. Chromtogr. A.* **839**, (1-2), 247 - 251.
- Gale, E. F., y Folkers, J. P. (1953) "The assimilation of aminoacids by bacteria. XV. Action of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*" *Biochem. J.* **53**, (3), 493-498.
- George, L., Mihalyi, J., Edmondson, A., Daigneault, J., Kagonyera, G., Willits, N., y Lucas, M. (1988) "Topically applied furazolidone or parenterally administered oxytetracycline for the treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **192**, (10), 1415-1422.
- George, L. W. (1990b) "Managing bovine pinkeye" *Calif. Agr.* **44**, (2), 11-12.
- Girardi, C., Re, G., Farca, A. M., Dacasto, M., Ferrero, E., y Eandi, M. (1990) "Blood kinetics of sulfamonomethoxine and oxytetracycline following intrauterine spray injection in dairy cows" *Pharmacol. Res.* **22**, (2), 79-86.
- Griffin, D. D. (1979) "Experimental oxytetracycline toxicity feedlot heifers" *Bov. Prac.* **14**, 37-40.

- Grogono-Thomas, R. (1994) "The use of long-acting oxytetracycline for the treatment of ovine footrot" *Br. Vet. J.* **150**, (6), 561-568.
- Grossman, E. R., Walchek, A., y Freedman, H. (1971) "Tetracyclines and permanent teeth: the relation between dose and tooth color" *Pediatrics.* **47**, (3), 567-570.
- Gundersen, B. W., Ross, G. H., Ibrahim, K. H., y Rotschafer, J. C. (2001) "What do we really know about antibiotic pharmacodynamics?" *Pharmacother.* **21**, (11s), 302s-318s.
- Hall, W. F., Kniffen, T. S., Bane, D. P., Bevill, R. F., y Koritz, G. D. (1989) "Plasma concentration of oxytetracycline in swine after administration of the drug intramuscularly and orally in feed" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**, (9), 1265-1268.
- Hannan, P. C. T., Windsor, G. D., De Jong, A., Schmeer, N., y Stegemann, M. (1997) "Comparative Susceptibility of Various Animal-Pathogenic Mycoplasmas to Fluoroquinolonas" *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**, (9), 2037-2040.
- Hash, J. H., Wishnick, M., y Miller, P. A. (1964) "On the mode of action of the tetracycline antibiotics in staphylococcus aureus" *J. Biol. Chem.* **239**, (6), 2070 - 2078.
- Hasselberger, M. L. (1993) "Assay of oxytetracycline in animal feed by liquid chromatography and microbiological plate assay" *J. AOAC int.* **76**, (1), 39 - 43.
- Hauschke, D., Steinijans, V. W., y Diletti, E. (1990) "A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies" *Int. J. Clin. Pharmacol, Therap. Toxicol.* **28**, (2), 72-80.
- Hernández, M., Borrul, F., y Calull, M. (2000) "Determination of oxytetracycline and some impurities in plasma by non - aqueous Capillary electrophoresis using solid - phase extraction" *Chromatographia.* **52**, 279 - 284.
- Horspool, L. J., y Mckellar, A. Q. (1990) "Disposition of oxytetracycline in horse, ponies and donkeys after intravenous administration" *Equine. Vet. J.* **22**, (4), 284-285.

- Hosie, B. D. (1988) "Keratoconjunctivitis in hill Sheep flock" *Vet. Rec.* **122**, (2), 40-43.
- Hosie, B. D., y Greig, A. (1995) "Role of oxytetracycline dihydrate in the treatment of *Mycoplasma*- associated ovine keratoconjunctivitis in Lambs" *Br. Vet. J.* **151**, (1), 83-88.
- Howell, H. R., Rhodig, L. L., y Sigler, A. D. (1984) " Liquid chromatographic determination of chlortetracycline in premixes" *J. AOAC int.* **67**, (3), 572-575.
- Huang, T. S., Du, W. X., Marshal, M. R., y wei, C. I. (1997) "Determination of oxytetracycline in raw and cooked channel catfish by capillary electrophoresis" *J. Agric. Food. Chem.* **45**, 2062-2065.
- Hunneman, W. A., Pijpers, A., Lommerse, J., Crauwels, A. P., y Verheijden, J. H. (1994) "Prophylaxis of pleuropneumonia in pis by in-feed medication with oxytetracycline and the subsequent transmission of infection" *Vet. Rec.* **134**, (9), 215-218.
- Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N., y Yamada, M. (1987) "Improvement of chemical analysis of antibiotics, XIII. Systematic simultaneous of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr.* **411**, 313-323.
- Jacobs, M. R. (1999) "Pharmacodynamic approach to antimicrobial treatment of respiratory infections" *Symposium Isaar 1999*.
- Jacobs, M. R. (2001) "Pharmacodynamic breakpoints: new concepts for old problems" *Simposium Isaar 2001.* **12**, 178-186.
- Jordan, D., y Venning, C. M. (1995) "Treatment of ovine dermatophilosis with long acting oxytetracycline or a lincomycin-spectinomycin combination" *Aust. Vet. J.* **72**, (6), 234-236.
- Kapusnik-uner, J. E., Sande, M. A., y Chambers, H. F. (1996) "Farmacos Antimicrobianos:Tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y diversos antimicrobianos" en: *Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica* (A. G. Goodman, ed.), McGraw-Hill interamericana, Mexico DF, pp. 1193-1224.

- Khan, N. H., Roets, E., Hoogmartens, J., y Vanderhaeghe, H. (1987) "Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr.* **405**, 229 - 245.
- Kikuvi, G. M., Mitema, E. S., y Buoro, I. B. (2001) "The pharmacokinetics of a long-acting oxytetracycline formulation in healthy dogs and in dogs infected with ehrlichia canis" *Vet. Res. Commun.* **25**, (5), 391-400.
- Kirkwood, J. K., y Widdowson, M. A. (1990) "Interspecies variation in the plasma half-life of oxytetracycline in relation to body weight" *Res. Vet. Sci.* **48**, (2), 180-183.
- Knapp, J. S., Zenilman, J. M., Biddle, J. W., Perkins, G. H., DeWitt, W. E., Thomas, M. L., Johnson, S. R., y Morse, S. A. (1987) "Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline" *J. Infect. Dis.* **155**, (4), 819 -822.
- Knox, J. H., y Jurand, J. (1975) "Separation of tetracyclines by High-speed liquid chromatography" *J. Chromatogr.* **110**, (1), 103-115.
- Kumar, R., y Malik, J. K. (1998) "Some pharmacokinetic parameters and dosage regimens for a long-acting formulation of oxytetracycline in 6-to 8-month-old male calves" *Vet. Res. Commun.* **22**, (8), 533-544.
- Kumar, R., y Malik, J. K. (1999) "Influence of experimentally induced theileriosis (*Theileria annulata*) on the pharmacokinetics of a long acting formulation of oxytetracycline (OTC-LA)" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **22**, (5), 320-326.
- Kunin, C. M. (1967) "A guide to use of antibiotics in patients with renal diseases. A table of recommended doses and factors governing serum levels" *Ann. Intern. Med.* **67**, (1), 151-158.
- Lairmore, M. D., Alexander, A. F., Powers, B. E., Milisen, W. B., y Spraker, T. S. (1984) "Oxytetracycline associated nephrotoxicosis in feedlot cattle" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185**, (7), 793-795.

- Landoni, M. F., y Errecalde, J. O. (1992) "Tissue concentrations of a long-acting oxytetracycline formulation after intramuscular administration in cattle" *Rev. Sci. Tech.* **11**, (3), 909-915.
- Lewis, G. E., Crumrine, M. H., Jennings, P. B., y Fariss, B. L. (1973) "Therapeutic value of tetracycline and ampicillin in dogs infected with *Brucella canis*" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163**, 239-241.
- Ling, G. V., Creighton, S. R., y Ruby, A. L. (1981) "Tetracycline for oral treatment of canine urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **179**, (6), 578-579.
- Loria, G. R., Sammartino, C., Nicholas, R. A., y Ayling, R., D. (2003) "In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin" *Res. Vet. Sci.* **75**, (1), 3-7.
- Love, R. J. (1977) "Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs" *Vet. Rec.* **100**, (4), 65-68.
- MacNeil, J. D., Martz, V. K., Korsrud, G. O., Salisbury, C. D., Oka, H., Epstein, R. L., y Barnes, C. J. (1996) "Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in edible animal tissues, liquid chromatographic method: collaborative study" *J. AOAC Int.* **79**, (2), 405-417.
- Maritim, A. C., Sohlberg, S., Lindqvist, K., y Lokken, P. (1986) "A comparison of the oxytetracycline preparations Aquacycline^R and terramycin --100 with regard to absorption characteristics, local tissue reactions and residues following dewlap injections in calves" *Acta. Vet. Scand.* **27**, (3), 361-368.
- Markakis, P. K. (1996) "Determination of tetracycline in animal feeds in the presence of Other Drugs by Thin - layer Chromatography and microbiological method" *J. AOAC int.* **79**, (2), 375 - 379.
- Martínez, E. E., y Shimoda, W. (1988) "Liquid Chromatography determination of tetracycline residues in animal feeds" *J. AOAC Int.* **71**, (3), 477-480.

- Maxwell, I. H. (1968) "Studies of the binding of tetracycline to ribosomes in vitro" *Mol. Pharmacol.* **4**, (1), 25-37.
- Meijer, L. A., Ceyskens, K. G., De jong, K. T., y DE Greve, B. I. (1993) "Three phase elimination of oxytetracycline in veal calves; the presence of an extended terminal elimination phase" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **16**, (2), 214-222.
- Mercer, H. D., Teske, R. H., Long, P. E., y Showalter, D. H. (1978) "Drug residues in food animals II. plasma and tissues kinetics of oxytetracycline in young cross-bred swine" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **1**, 119-128.
- Merle, A., Mandell, A., y Mandell, G. L. (1991) "Agentes Antimicrobianos (continuación) Tetraciclinas, Cloranfenicol, eritromicina y agentes antimicrobianos varios", en: *Las bases Farmacológicas de la terapéutica* (M. PANAMERICANA, ed.), Mexico DF, pp. 1083-1109.
- Mevius, D. J., Vellenga, L., Breukink, H. J., y Nouws, J. F. (1986) "Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in pigolets following intravenous and oral administration" *Vet. Quarterly.* **8**, 274-284.
- Miller, G. E., y Bergt, G. P. (1974) "Oxytetracycline in bovine plasma, milk, and urine after intrauterine administration" *J. Dairy. Sci.* **59**, (2), 315-317.
- Moats, W. A., y Harik-khan, R. (1995) "Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk" *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 931-934.
- Monshouwer, M., y Witkamp, R. F. (2000) "Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response" *Vet. Quarterly.* **22**, (1), 17-20.
- Moreno, L., Serrano, J. M., Guimera, A., y Carceles, C. M. (1998) "Pharmacokinetics of oxytetracycline after intramuscular administration with lidocaine in Sheep comparison with a conventional formulation" *Res. Vet. Sci.* **65**, (3), 209-213.
- Mourot, D., Delépine, B., Boisseau, J., y Gayot, G. (1980) "Reversed-phase ion pair chromatography of oxytetracycline, epioxyteracycline and nhydroxytetracycline" *J. Chromatogr.* **190**, 486-488.

- Mueller-brennecke, D. L., Reed, S. J., y Waisner, D. L. (1980) "Turbidimetric microbiological determination of oxytetracycline hydrochloride in finished feed and a feed premix: Collaborative study" *J. AOAC Int.* **63**, (5), 1038- 1043.
- Mulders, E. J., y Van De Lagemaat, D. (1990) "Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography" *J. Pharma. Biomed. Anal.* **7**, (12), 1829-1835.
- Nelis, H. J., Vandenbranden, J., De Kruif, A., Belpaire, F., y De Leenheer, A. P. (1992) "Liquid Chromatographic determination of oxytetracycline in bovine plasma by double- phase extraction" *J. Pharm. Sci.* **81**, (12), 1216-1218.
- Nelson, M. L. (1998) "Chemical and biological dynamics of tetracyclines" *Adv. Dent. Res.* **12**, 5-11.
- Nielsen, P., y Gyrd-Hansen, N. (1996) "Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **19**, (4), 305-311.
- Nouws, J. F. (1986) "Factors affecting the oxytetracycline disposition of kinetics of ruminants" *Rev. Irish. Vet. News.* **15**, 9-15.
- Nouws, J. F., Smulders, A., y Rappalini, M. (1990) "A comparative study on irritation and residue aspect of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and Sheep" *Vet. Quarterly.* **12**, (3), 129-138.
- Nouws, J. F., y Vree, T. B. (1983) "Effect of injection site on the bioavailability of an oxytetracycline formulation in ruminant calves" *Vet. Quarterly.* **5**, (4), 165-170.
- Obach, V. R., y Peraire, G. C. (1998) "Ensayos de bioequivalencia." en: *Biofarmacia y Farmacocinética* (S. A. Editorial Sintesis, Ed.), Madrid, pp. 56-76.
- Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., y Yamada, M. (1987) "Improvement of chemical analysis of antibiotics X. Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr A.* **393**, (2), 285-296.

- Oka, H., Ito, Y., y Matsumoto, H. (2000) "Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods" *J. Chromatogr A*. **882**, (1-2), 109-133.
- Oka, H., y Suzuki, M. (1984) "Improvement of chemical analysis of antibiotics VII. Comparison of analytical methods for determination of impurities in tetracycline pharmaceutical preparations" *J. Chromatogr.* **314**, 303-311.
- Onji, Y., Uno, M., y Tanigawa, K. (1984) "Liquid Chromatographic determination of tetracycline residues in meat and fish" *J. AOAC Int.* **67**, (6), 1135-1137.
- Payne, M. A., Babich, J. G., Bulgin, M., Lane, M., Wetzlich, S., y Craigmill, A. L. (2002) "Serum pharmacokinetics and tissue and milk residues of oxytetracycline in goats following a single intramuscular injection of long-acting preparation and milk residues following a single subcutaneous injection" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **25**, (1), 25-31.
- Pena, A.L., Lino, C.M., y Silveira, I.N. (1999) "Determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection" *J. AOAC Int.* **82**, (1), 55-60.
- Perrier, D., y Gibaldi, M. (1982) "General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state" *J. Pharm. Sci.* **71**, (4), 474-475.
- Pijpers, A., Schoevers, E. J., y Van gogh, H. (1990) "The pharmacokinetics of oxytetracycline following intravenous administration in healthy and diseased pigs" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **13**, (3), 320-326.
- Pilloud, M. (1973) "Pharmacokinetic plasma protein binding and dosage of oxytetracycline in cattle and horse" *Res. Vet. Sci.* **15**, (2), 224 -230.
- Prescott, J.f., y Baggot, J. D. (2000) "Tetracyclines", en: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (I. S. U. Press, ed.), Iowa, pp. 275-289.
- Ragheb, H.S., Cummings, A. M., y Browning, B. M. (1973) "Microbiological assay of oxytetracycline in feed: Manual turbidimetric assay and plate assay" *J. AOAC Int.* **56**, (1), 23-30.

- Reese, R. E., y Douglas, R. G. (1987) "Técnicas de laboratorio". *Diaz de santos*. 19-40.
- Reja, A., Gonzalez, R., Serrano, J. M., Santiago, D., Guimera, M. E., y Cano, M. (1994) "Oxytetracycline and tetracycline residues in goat milk" *European Association for Veterinary Pharmacology and Therapeutics proceedings of the 6th International Congress Edinburgh*. **7-11** August, 82.
- Reja, A., Moreno, L., Serrano, J. M., y Sant Lago, D. (1996) "Concentration-time profiles of oxytetracycline in blood, kidney and liver of tench (*Tinca tinca* L) after intramuscular administration" *Vet. Hum. Toxicol.* **38**, (5), 344-347.
- Roncada, P., Ermini, L., Schleuning, A., Stracciari, G. L., y Strocchia, A. (2000) "Pharmacokinetics and residual behaviour in milk of oxytetracycline in cows following administration of uterine pessaries" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23**, (5), 281-285.
- Rule, R., Moreno, L., Serrano, J. M., Garcia, R. A., Moyano, R., y Garcia, J. (2001) "Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetracyclines administered parenterally to dairy goats" *Aust. Vet. J.* **78**, (7), 492-496.
- Ryan, J. J., y Dupont, J. A. (1974) "Chemical Analysis of Tetracycline Residues in animal Tissues" *J. AOAC Int.* **57**, (4), 828-831.
- 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 there of 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.
- San Martin, B., Lagos, R., y Gai, M. N. (1996) "Estudio cinético de oxitetraciclina de larga acción en bovinos de lechería" *Arch. Med. Vet.* **XXVIII** (2), 19-25.

- Szczesny, S., Nau, H., y Hamscher, G. (2003) "Residues Analysis of tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry" *J. Agric. Food. Chem.* **51**, (3), 697-703.
- Schentag, J. J., Ballow, C. H., y Paladino, J. A. (1992) "Dual individualization with antibiotics: integrated antibiotic management strategies for use in hospitals", en: *Applied pharmacokinetics* (J. J. Evans WE; Schentag, wj, ed.), pp. 1-20.
- Schifferli, D., Galeazzi, R. L., Nicolet, J., y Wanner, M. (1982) "Pharmacokinetics of oxytetracycline and therapeutic implications in veal calves" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **5**, 4), 247-257.
- Schnappinger, D., y Hillen, W. (1996) "Tetracycline: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms" *Arch. Microbiol.* **165**, (6), 359-369.
- Sharma, J. P., Perkins, E. G., y Bevill, R. F. (1977) "Reversed-phase high -performance liquid chromatographic determination of tetracyclines in urine and plasma" *J. chromatogr.* **134**, (2), 441-450.
- Shils, M. E. (1963) "Renal disease and the metabolic effects of tetracycline" *Ann. Intern. Med.* **58**, 389 - 408.
- Sneader, W. (1996) "Drug prototypes and their exploitation" *Eur. J. Med. Chemistry.* **32**, (1), 91-95.
- Sokol, J., y Matisova, E. (1994) "Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction" *J. Chromatogr.* **699**, (1-2), 75-80.
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., y Salyers, A. A. (1992) "Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance" *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, (4), 387-399.
- Spivey, J. M. (1992) "The postantibiotic effect." *Clin. Pharm.* **11**, (10), 865-875.

- Sporns, P., Kwan, S., y Roth, L. A. (1986) "HPLC analysis of oxytetracycline residues in honey" *J. Food. Prot.* **49**, 383.
- Stalheim, O. H. (1967) "Chemotherapy of renal leptospirosis in swine" *Am. J. Vet. Res.* **28**, 161.
- Standiford, H. C. (1995) "Tetracyclines and chloramphenicol", en: *In, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease 4th ed* (G. L. Mandell, J. E. Bennett, y R. Dolin, eds.), Churchill Livingstone, New York, pp. 306 - 317.
- Stehly, G. R., y Gingerich, W. H. (1999) "A Binding study of oxytetracycline in the edible fillet of Rainbow trout: Analysis by a liquid chromatography method and the official microbial inhibition assay" *J. AOAC Int.* **82**, (4), 866-870.
- Steigbiegel, N. H., Ree, C. W., y Finland, M. (1968) "Susceptibility of common pathogenic bacteria to seven tetracycline antibiotic in vitro" *Am. J. Med. Sci.* **255**, 179-195.
- Sumano Lopez, H. S., y Ocampo Camberos, L. (1999) "Tetraciclina, Cloranfenicol, Tiamfenicol y Florfenicol", en: *Farmacología Veterinaria* (M.-H. INTERAMERICANA, ed.), México, D.F, pp. 148-160.
- Sun, Y., Peng, Y., Aksornkoae, N., Johnson, J. R., Boring, J. G., Scruggs, D., Cooper, R. C., Laizure, S. C., y Shukla, A. J. (2002) "Controlled release of oxytetracycline in sheep" *Journal of controlled release.* **85**, 125-134.
- Tavers, M. F., y McGuffin, V. L. (1994) "Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis" *J. Chromatogr A.* **686**, 129 - 142.
- Terhune, T. N., y Upson, D. W. (1989) "Oxytetracycline pharmacokinetics, tissue depletion, and toxicity after administration of a long-acting preparation at double the label dosage" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**, (4), 911-917.

- Toutain, P. L., y Raynaud, J. P. (1983) "Pharmacokinetics of oxytetracycline in young cattle: comparison of conventional vs long-acting formulations" *Am. J. Vet. Res.* **44**, (7), 1203-1209.
- Trinh, H. T., Billington, S. J., Field, A. C., Songer, J. G., y Jost, B. H. (2002) "Susceptibility of *Arcanobacterium Pyogenes* from different sources to tetracycline, macrolides and lincosamide antimicrobial agents" *Vet. Microbiol.* **85**, (4), 353-359.
- Tsai, C. E., y Kondo, F. (1994) "Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residues" *Res. Vet. Sci.* **56**, (3), 277-283.
- Ueno, R., Uno, K., y Aoki, T. (1992) "Determination of oxytetracycline in blood serum by high-performance liquid chromatography with direct injection" *J. Chromatogr.* **573**, (2), 333-335.
- Van Bambeke, F., y Tulkens, P. M. (2001) "Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics" *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**, (1), S17-S23.
- Vazquez, D. (1964) "The binding of chloramphenicol by ribosomes from bacillus megaterium" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, (5), 464-468.
- Weisblum, B., y Davies, J. (1968) "Antibiotics inhibitors of bacterial ribosome" *Bacteriol. Rev.* **32**, (4), 493-528.
- White, C. R., Moats, W. A., y Kotula, k. L. (1993) "Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk" *J. AOAC Int.* **76**, (3), 549-554.
- Xia, W., Gyrd-arlington, N., y Nielsen, P. (1983) "Comparison of pharmacokinetic parameters for two oxytetracycline preparations in pigs" *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **6**, 2), 113-120.
- Yoder, H. W., y Packer, R. A. (1954) "Bovine serum concentration of terramycine (Oxytetracycline) following intravenous and intramuscular administration" *J. Am. Vet. Res.* **15**, (56), 412-416.

- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y. S., y Kojima, A. (2001) "Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella multocida* Isolated from cattle and pigs" *J. Vet. Med B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 48, (7), 555-560.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., y Kojima, A. (2002a) "Minimum Inhibitory Concentrations of 20 Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infections in Japan" *J. Vet. Med B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* **49**, (9), 457-460.
- Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M., y Endoh, Y. S. (2002b) "Comparative in vitro Activity of 16 Antimicrobial Agents against *Actinobacillus pleuropneumonia*" *Vet. Res. Commun.* **26**, (1), 11-19.
- Ziv, G., y Sulman, F. G. (1974) "Analysis of pharmacokinetic Properties of nine Tetracycline Analogues in Dairy Cows and Ewes" *Am. J. Vet. Res.* **35**, (9), 1197-1201.

VIII. ANEXO

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN
DE OXITETRACICLINA EN PLASMA Y TEJIDOS DE BOVINO”**

VIII.1. INTRODUCCIÓN

VIII.1.1 Antecedentes

VIII.1.1.1. Métodos analíticos de detección y cuantificación de OTC

Existe una amplia variedad de métodos analíticos para la determinación de la OTC en plasma y en diferentes tejidos animales. Algunos de éstos métodos son cualitativos y se utilizan como técnicas de cribado, siendo estos principalmente los métodos microbiológicos. Los métodos cuantitativos son más sofisticados y sirven para confirmar la concentración presente de fármaco en las diferentes matrices biológicas analizadas.

VIII.1.1.1.1. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos son muy utilizados por su sencillez, bajo coste y la rapidez en su desarrollo. La mayor desventaja de estos métodos es la dificultad de distinguir entre fármacos parecidos y metabolitos activos. Como la mayoría de los antibióticos, las tetraciclinas son determinadas tradicionalmente por procedimientos microbiológicos. Sin embargo, el ensayo microbiológico refleja la concentración total y no puede identificar la concentración individual de cada tetraciclina y/o sus metabolitos activos.

Existen diferentes métodos microbiológicos para determinar las tetraciclinas en plasma y en diferentes matrices biológicas. Algunos autores utilizaron el método de difusión en gel de agar (Markakis, 1996; Kumar y Malik, 1998) siendo microorganismos indicadores *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* y pudiendo detectar niveles de hasta 0.125 µg/ml.

Otros autores han utilizado el método de cilindros en placa estandarizado por la AOAC en 1984 (Hasselberger, 1993; San Martin y cols., 1996; De Wasch y cols., 1998) para determinar OTC, usando *Bacillus subtilis* como microorganismo indicador. Otros autores escogieron el método turbidimétrico (Ragheb y cols., 1973; Mueller-brennecke y cols., 1980) para cuantificar OTC y también compararon este método con el microbiológico estandarizado por la AOAC, observando que la recuperación de ambas metodologías era similar.

Tsai y cols (1994) realizaron la separación de 5 tetraciclinas diferentes (oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC), metaciclina (MTAC), doxiciclina (DC) por el método de bioensayo y para confirmar y cuantificar estos fármacos utilizaron cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

De Wach y cols (1998) determinaron también OTC, CTC, TC y DC en músculo de cerdo y pollo usando como primera etapa el método microbiológico y utilizando *Bacillus subtilis* como microorganismo indicador, seguido por un análisis de ELISA. Finalmente para confirmar y cuantificar cada uno de los antibióticos utilizados realizaron el análisis por CLAE.

Stehly y cols (1999) compararon los resultados del test microbiológico con el análisis por CLAE para determinar OTC en músculo de pescado, comprobando que ambos daban resultados similares.

VIII.1.1.1.2. Métodos químicos

Los métodos químicos presentan la ventaja de poder separar, identificar y cuantificar las tetraciclinas que han sido utilizadas de forma individualizada, incluso a concentraciones muy bajas, aunque esto a veces supone realizar un procedimiento laborioso que permita la eliminación de las interferencias que aparecen en el análisis de matrices complejas como son el hígado, el riñón, el músculo o la grasa.

a. Tratamiento de las muestras. Preparación, extracción y purificación

Debido a que las tetraciclinas forman quelatos complejos con cationes bivalentes y trivalentes y también a su gran capacidad para unirse a las proteínas, son necesarios disolventes y ácidos fuertes como etilacetato, metanol y ácido clorhídrico para homogeneizar y extraer las tetraciclinas de las muestras biológicas (Onji y cols., 1984). Sin embargo, las tetraciclinas se descomponen en su forma anhidrido bajo condiciones ácidas (pH =2) o se convierten en su epímero durante la extracción. Todo ello comporta que se realice la extracción usando disolventes y ácidos débiles que contienen tampón EDTA (0.1 M pH=4) (Ikai y cols., 1987; Mulders y Van De Lagemaat, 1990).

- **Partición líquido-líquido:** la partición líquido-líquido, basada en la inmiscibilidad en diferentes solventes, es útil para disminuir interferencias.

Nelis y cols (1992) utilizaron este método para extraer la OTC del plasma bovino usando tampón fosfato a pH 5.4 y acetato de etilo, alcanzando una recuperación de un 80% para la OTC.

White y cols (1993), Fletouris y cols (1990) y Boatto y cols (1999) utilizaron el mismo procedimiento para extraer OTC y TC de la leche, pudiendo recuperar en esta ambos analitos.

- **Extracción en Fase Sólida. (EFS):** es una técnica que cada vez tiene mayor aceptación, debido a que los problemas que presenta la extracción líquido-líquido quedan en parte solventados, mejorándose significativamente la recuperación.

Los diferentes trabajos realizados que escogen este tipo de extracción recogen diversos materiales que permiten recuperar los analitos (Ryan y Dupont, 1974; Onji y cols., 1984; Farrington y cols., 1991), éstos utilizan resinas como la amberlita XAD-2. En este tipo de columnas se producen una serie de interacciones entre el adsorbente y los diferentes analitos que permiten su extracción según los solventes de elución (MacNeil y cols., 1996) utilizaron la columna octadesilica como soporte sólido.

b. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE)

En los últimos años se han publicado varios métodos basados en esta técnica analítica. Son técnicas que tienen una mayor especificidad y que aumentan la discriminación entre moléculas similares.

Existen diversos métodos para la separación, detección y cuantificación de tetraciclinas por CLAE en líquidos corporales y tejidos. La mayoría se basan en el análisis con columnas cromatográficas en fase reversa, donde la fase estacionaria es de naturaleza apolar (grupos octadecil ligados a la sílica que forman parte del relleno de la columna). Debido a que las tetraciclinas forman quelatos complejos con cationes divalentes y trivalentes y para evitar su adsorción a las columnas de fase reversa, se suele usar una fase móvil que contenga varios ácidos como ácido fosfórico (Sharma y cols., 1977; Aoyama y cols., 1991) o ácido cítrico (De Leenheer y Nelis, 1979; Nelis y cols., 1992) y EDTA (Knox y Jurand, 1975; Howell y cols., 1984; Chappell y cols., 1986; Sporns y cols., 1986). No obstante, no se han podido separar bien las tetraciclinas

con estos ácidos, razón por la que se suele utilizar el ácido oxálico que permite obtener una mejor separación (Oka y cols., 2000).

Sharma y cols. (1977) describieron un método por CLAE para la separación y determinación cuantitativa de OTC, TC y CTC en plasma y orina. Con este método en fase reversa pudieron cuantificar cantidades inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ en orina e inferior a 1.5 $\mu\text{g/ml}$ en plasma.

Ueno y cols. (1992) usaron también CLAE para determinar OTC en plasma de diferentes especies animales, obteniendo un límite de detección de 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

Sokol y cols (1994) analizaron OTC, TC y CTC en músculo de bovino y porcino por CLAE usando detección UV *diode-array* y consiguiendo un límite de detección de 50 $\mu\text{g/kg}$.

Otros autores han detectado en muestras de leche la presencia de las tetraciclinas (Fletouris y cols., 1990; Farrington y cols., 1991; Carson, 1993; White y cols., 1993; Moats y Harik-khan, 1995; Boatto y cols., 1999; Furusawa, 1999; Pena y cols., 1999) llegando a concentraciones de hasta 10 ng/g .

c. Otras técnicas

Aunque la cromatografía líquida de alta eficacia ha sido la técnica más utilizada en la detección de las tetraciclinas, algunos autores escogieron la cromatografía en capa fina (CCF) como técnica analítica para la detección de estas moléculas en diferentes tejidos animales y leche (Ryan y Dupont, 1974; Bossuyt y cols., 1976; Ikai y cols., 1987; Oka y cols., 1987; Oka y cols., 2000), obteniendo una buena separación. En general la CCF es muy simple y no necesita material sofisticado para llevarse a cabo pero en los diferentes trabajos publicados se ha podido observar que este método presenta como inconveniente que necesita de mucho tiempo para su análisis y es un método sólo cualitativo.

Otros autores escogieron la electroforesis capilar (EC) (Tavers y McGuffin, 1994; Chen y Gu, 1995; Huang y cols., 1997; Tjornelund y Hansen, 1997; Hernández y cols., 2000) para determinar diferentes tetraciclinas, presentando la ventaja de ser una técnica que utiliza pocos solventes, tiempos de separación muy corto y una buena separación.

No obstante, pocos la utilizan para determinar tetraciclinas a nivel de residuos en tejidos debido a que esta técnica no permite analizar grandes cantidades de muestra.

Huang y cols (1997) aplicaron la EC para determinar OTC en músculo de pescado y obtuvieron una recuperación alrededor de 92.9 %. Hernández y cols. (2000) también utilizaron la EC para determinar OTC y sus metabolitos en plasma porcino y obtuvieron una recuperación entre 90-100%.

Como técnicas mucho más complejas y sofisticadas algunos autores utilizaron espectrometría de masas como método de confirmación de la presencia de las tetraciclinas en muestras de huevos tras su análisis por CLAE. No obstante, son sistemas de determinación sofisticados que requieren una alta inversión y compleja infraestructura para poder ser llevadas a cabo (Sczesny y cols., 2003).

VIII.1.2. Validación del método analítico

Dada la importancia que los resultados de los estudios bioanalíticos tienen en el ámbito farmacológico, se hace cada vez más necesario disponer de técnicas de análisis que puedan satisfacer, con una total fiabilidad, las necesidades de estos ensayos. Esto se traduce en la puesta a punto de unos métodos analíticos rápidos, fiables, eficaces y selectivos que permitan hacer un control, tanto en el animal vivo como en su carne y productos derivados de su explotación.

Consecuentemente, no existe un método de aplicación universal, sino que para cada situación concreta deberá establecerse la validez del mismo a través del estudio de una serie de parámetros que serán los que permitan establecer, bajo criterios objetivos ya fijados, la validez del método utilizado para cuantificar los diferentes analitos.

VIII.1.2.1. Definiciones

Los parámetros analíticos considerados imprescindibles a la hora de validar un método son (EMEA/CVMP/590/98 y CVMP/VICH/591/98):

- **Linealidad:** La linealidad de un método analítico expresa su capacidad para dar lugar a medidas que son directamente o mediante una transformación matemática conocida, proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango.

- **Selectividad y especificidad:** los términos de selectividad y especificidad, considerados como equivalentes, se definen como la capacidad de un método analítico para medir exactamente y de manera específica el analito en presencia de todos los componentes que se espera que estén presentes en la muestra. Es decir, nos indica que las impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias que estén presentes en la muestra no interferirán en la determinación del analito.

- **Precisión:** expresa el grado de acercamiento entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras de una mezcla homogénea.
 - **Repetibilidad o precisión intradía:** es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre una misma muestra en las mismas condiciones (el mismo analista, los mismos aparatos, el mismo día, etc.).
 - **Reproducibilidad o precisión interdía:** es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre una misma muestra pero en condiciones diferentes (diferente analista, diferente día, diferentes aparatos, etc.).

- **Exactitud:** es la capacidad del método para proporcionar resultados próximos al verdadero. Es una medida del rigor del método analítico y refleja los posibles errores sistemáticos del mismo. Es un parámetro a partir del cual se evalúa la recuperación que presenta la metodología aplicada.

- **Límite de cuantificación (LQ):** es la mínima cantidad de analito que se puede determinar cuantitativamente en una muestra con precisión y exactitud aceptables.

- **Límite de detección (LD):** Es la mínima cantidad de analito que se puede detectar en una muestra.

- **Estabilidad:** la estabilidad del fármaco en una matriz biológica, se evalúa estudiando el comportamiento del mismo bajo las condiciones de almacenamiento de forma que pueda detectarse cualquier cambio o alteración en la molécula causado por este.

-

VIII.1.2.2 Cálculo de los parámetros

VIII.1.2.2.1. Linealidad

La linealidad del método se determina mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados, representando las concentraciones de la sustancia en estudio en el eje de abscisas y las áreas o relaciones de áreas con respecto al patrón interno en el eje de ordenadas.

Se puede considerar la linealidad de un método correcta cuando el coeficiente de correlación está lo más próximo a la unidad y cuando las variaciones en las pendientes de las rectas son mínimas.

VIII.1.2.2.2. Selectividad y especificidad

Se determina la selectividad de un método analítico, comparando los resultados del análisis de las muestras que contengan, impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias con los resultados del análisis de muestras blancas a los que se añadió el analito correspondiente, antes de someterlas al procedimiento de extracción.

VIII.1.2.2.3. Precisión

La precisión se expresa matemáticamente por la desviación estándar (DE) o preferiblemente, por el coeficiente de variación de los resultados del análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea.

Existen diferentes métodos para evaluar la precisión de un método analítico a partir de los coeficientes de variación (CV) obtenidos.

En este estudio se ha utilizado el método de Horwitz. Según este autor, se consideran válidos los resultados de determinación de la Reproducibilidad de un método cuando el CV obtenido sea inferior al valor encontrado al aplicar la siguiente fórmula:

$$CV < 2(1 - 0.5 \log c)$$

Donde c es la concentración teórica del analito expresada en ng/g o ng/ml.

En cuanto a la repetibilidad, se consideran válidos los resultados de la determinación cuando el CV correspondiente a las muestras analizadas es inferior o se encuentra dentro del intervalo 1/2 a 2/3 del valor obtenido al aplicar la fórmula anterior.

VIII.1.2.2.4. Exactitud

La exactitud se expresa en forma del error relativo medio (ERM), calculado como la diferencia entre el valor observado y el valor verdadero dividido por el valor verdadero (expresado en porcentaje). También se puede expresar la exactitud como el porcentaje de recuperación, calculado como la diferencia entre la concentración añadida y la observada tras extrapolar a una recta de calibrado sometida al procedimiento de extracción, y multiplicada por 100.

Los valores de ERM deben estar dentro del rango -50% y $+20\%$ para las concentraciones $< 1 \mu\text{g/kg}$ y entre -30% y $+10\%$ para las concentraciones $> 1 \mu\text{g/kg}$ (Document SANCO/1805/2000).

VIII.1.2.2.5. Límite de cuantificación

Se calcula a partir del análisis de las muestras que contengan la concentración más baja del analito, siendo la mínima cantidad de analito que se puede determinar cuantitativamente en una muestra con precisión y exactitud aceptables.

VIII.1.2.2.6. Límite de detección

Se calcula como la desviación estándar del pico más grande del ruido de fondo de un número determinado de muestras blancas (en cm). El límite de detección se evalúa a partir de la fórmula:

$$\text{L.D.} = 3.3 \sigma / S$$

Donde σ es la desviación estándar del ruido de fondo de las muestras blancas analizadas y S la pendiente media de la linealidad intradía.

VIII.2. OBJETIVOS

- Desarrollar un método analítico por CLAE que permita la cuantificación de OTC en plasma de terneras de forma precisa, exacta y dentro del intervalo en que se encontraran las muestras procedentes de terneros tratados con OTC a una dosis de 30 mg/kg po vía i.m. y en dosis única.
- Desarrollar un método analítico que permita la detección conjunta de la OTC+ 4-epi OTC en las muestras de diferentes tejidos diana fijados por la legislación (músculo, hígado, riñón y punto de inyección) procedentes de terneros tratados con OTC a esta misma dosis y que comprenda el rango de concentraciones de la mitad del LMR y 2 veces LMR.

VIII.3. MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.3.1. Material y método analítico de OTC en plasma

VIII.3.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo (Scharlau, calidad CLAE).
- Metanol (Scharlau, calidad CLAE).
- Citrato trisódico dihidratado (Merck, para análisis).
- Acido Oxálico 2 hidratado (Panreac, para análisis).
- Hidróxido Sódico (Riedel de Haën, calidad CLAE).
- Agua bidestilada.
- Minicolumna de extracción en fase sólida de octadecilsilica (500 mg, Bond Elut Varian).

VIII.3.1.2. Soluciones

- *Tampón citrato trisódico 0.1 M (pH=6.8)*: Se pesaron 5.7 g de citrato trisódico y se añadieron 100 ml de agua bidestilada. Se llevó a pH 6.8 con NaOH 50%.
- *Acido oxálico 0.02 M (pH=2)*: se pesaron 1.2607 g de ácido oxálico y se añadieron 500 ml de agua bidestilada y filtrada. Se llevó a pH 2.0 con NaOH 1 M.
- *Fase móvil*: se mezcló un 75 % del ácido oxálico 0.02 M (pH 2.0) con un 25 % de acetonitrilo/metanol (1.5/1).

VIII.3.1.3. Patrones

- OTC dihidratado (Lote 112H0123, SIGMA).
- TC hidrocloreto (Lote 46H1470, SIGMA).

VIII.3.1.3.1. Preparación de las soluciones patrón

a. Soluciones primarias del patrón

- 1 mg/ml de OTC: se pesaron 100 mg de OTC y se introdujeron en un matraz aforado de 100 ml, se enrasó con acetonitrilo.
- 1 mg/ml de TC: se pesaron 100 mg de TC y se introdujeron en un matraz aforado de 100 ml, se enrasó con agua bidestilada.

b. Soluciones patrón secundarias

- 0.1 mg/ml de OTC y TC: se tomó 1 ml de las soluciones primarias de OTC y TC y se diluyeron con 9 ml de acetonitrilo y agua bidestilada, respectivamente.
- 0.01 mg/ml de OTC y TC: se tomaron 0.1 ml de las soluciones primarias de OTC y TC y se diluyeron con 9.9 ml de acetonitrilo y agua bidestilada, respectivamente.
- 0.001 mg/ml de OTC y TC: se tomaron 0.1 ml de las soluciones secundarias de 0.1 mg/ml de OTC y TC y se diluyeron con 9.9 ml de acetonitrilo y agua bidestilada, respectivamente.

VIII.3.1.4. Material fungible

- Tubos de vidrio de 15 ml.
- Tubos de vidrio cónicos de 30 ml.
- Tubos de vidrio para inyector automático. Microviales de 200 µl.
- Pipetas pasteur de vidrio.
- Jeringas de plástico.

VIII.3.1.5. Instrumentación**VIII.3.1.5.1. Equipos usados en la extracción**

- Balanza de precisión (Sartorius, Handy H51).
- Centrifuga (Haraeus Sepatech 2.ORS).
- Agitador horizontal.
- Microjeringa de vidrio (Hamilton, 10, 25, 50, 100 µl).
- PHmetro (Gilson).
- Nitrogenador (UHPLCMS 25)

VIII.3.1.5.2. Equipos de CLAE

Bomba (Waters 515 CLAE) conectada a un inyector automático (Waters 717 plus), con un detector ultravioleta (Waters 486) y equipado con un sistema informático de recogida de datos (Turbochrom TC6).

La columna fue una ODS-2, 5 μm (4.6 x 200 mm) (Waters).

VIII.3.1.6. Condiciones cromatográficas

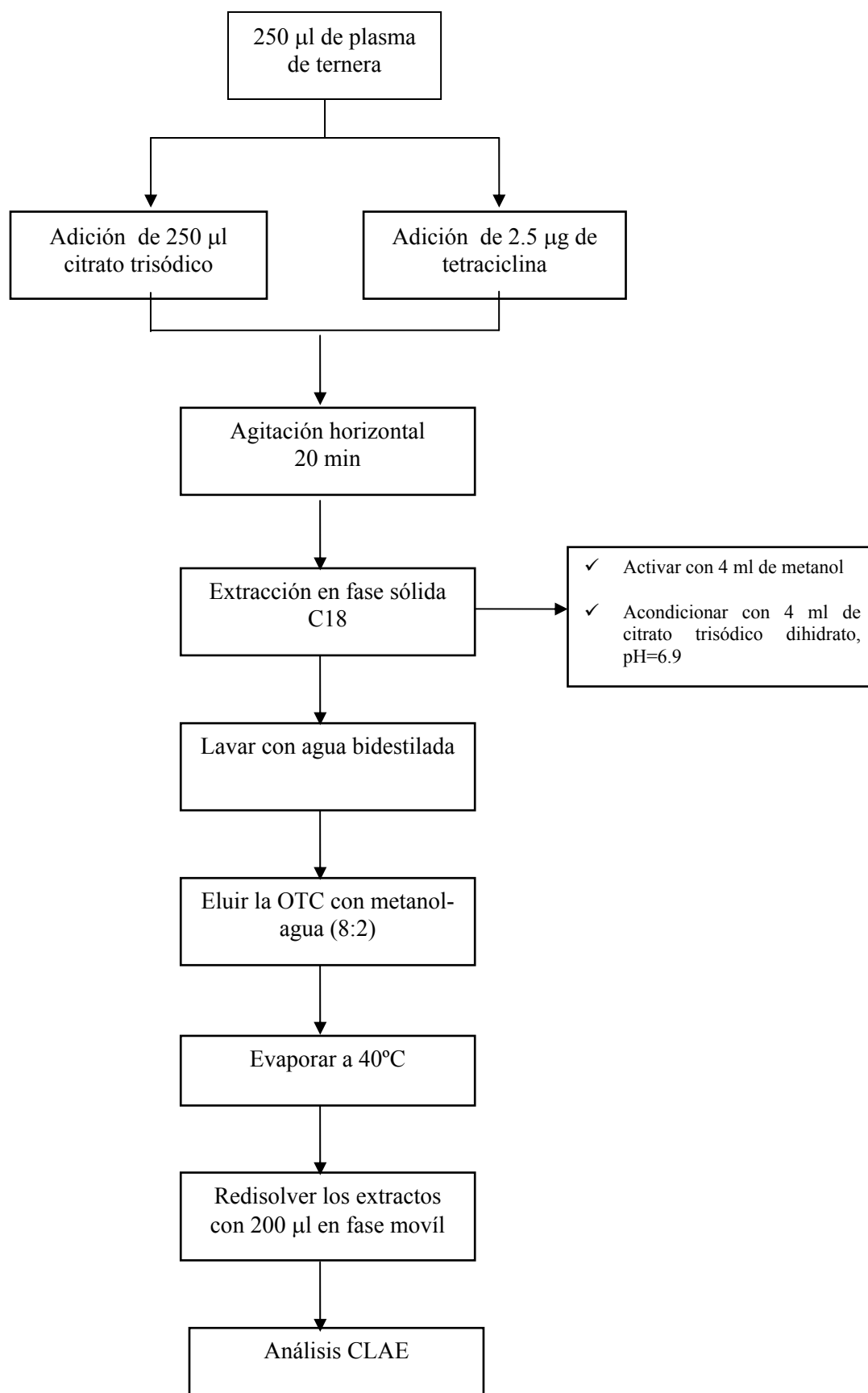
- *Fase móvil:* ácido oxálico 0.02 M pH 2 / Acetonitrilo / Metanol (75/15/10)
- *Fase estacionaria:* columna de fase reversa C-18 ODS-2,5 μm (4.6 x 200 mm)
- *Flujo:* 1.5 ml/min
- *Detección UV:* $\lambda=280$ nm

VIII.3.1.7. Preparación de las escalas de calibración

Las escalas de calibración se prepararon añadiendo a 250 μl de plasma de ternera concentraciones crecientes de OTC (0.25, 0.5, 1, 2, 5 $\mu\text{g/ml}$) y se añadieron 2.5 μg de TC como patrón interno.

VIII.3.1.8. Tratamiento de las muestras de plasma

En tubos de vidrio, de 10 ml se colocaron 250 μl de plasma a los que se añadieron 2.5 μg de TC como patrón interno. Posteriormente, se añadieron 250 μl de tampón citrato trisódico dihidrato 0.1 M (pH 6.8). Se agitaron ligeramente las muestras y se pasaron a través de una minicolumna de extracción en fase sólida de octadecilsilica (activada con 4 ml de metanol y acondicionada con 4 ml de tampón citrato trisódico dihidrato, pH 6.8). Después de pasar las muestras por el cartucho, éste se lavó con 1 ml de agua, y se eluyó la OTC con 2 ml de metanol-agua (8:2). El eluido se evaporó a sequedad en Speed-Vac y el extracto seco se redisolvió en 200 μl de fase móvil para proceder a su análisis por CLAE (ver esquema1).

Esquema1. Tratamiento de las muestras de plasma de ternera

VIII.3.2. Validación del método analítico de OTC en plasma bovino

El estudio de la linealidad en el plasma se realizó interdía e intradía.

VIII.3.2.1. Linealidad intradía

Se estudió la linealidad intradía del plasma en terneras, añadiendo a las muestras concentraciones crecientes de OTC (ver cuadro 1) y 25 µl de TC de la solución 0.1 mg/ml como patrón interno. Paralelamente, se trabajó con blanco de plasma para comprobar que no aparecieran interferencias en el tiempo de retención de la OTC. Las muestras se sometieron al proceso de extracción explicado en el apartado VIII.3.1.8. Las muestras fueron analizadas por quintuplicado en un mismo día.

Cuadro 1. Cantidad de OTC añadida a las muestras correspondientes a la recta de calibrado de plasma de bovino.

Punto de la recta	concentración de OTC añadida (µg/ml)	concentración de TC añadida (µg/ml)
R ₁	0.25	
R ₂	0.5	
R ₃	1.0	10
R ₄	2.0	
R ₅	5.0	

VIII.3.2.2. Linealidad interdía

La linealidad interdía se realizó de la misma manera y a las mismas concentraciones que la linealidad intradía pero las muestras de la recta fueron analizadas en 5 días diferentes.

VIII.3.2.3. Selectividad y especificidad

La especificidad del método se evaluó a partir de la comparación de la matriz biológica analizada a la que se añadió una concentración conocida de OTC y TC, con blancos de la misma matriz y se comprobó que no aparecía ningún pico con el mismo tiempo de retención que los analitos estudiados.

VIII.3.2.4. Precisión y exactitud

VIII.3.2.4.1. Precisión

Para calcular la precisión del método analítico se tomaron 4 muestras de plasma libres de fármaco de 250 µl a las cuales se añadieron concentraciones crecientes de OTC (las mismas concentraciones que se añadieron para estudiar la linealidad del método y se han descrito en el cuadro 1) y 2.5 µg de TC. Estas muestras se sometieron al proceso de extracción descrito en el apartado **VIII.3.1.8.** y se analizaron en días diferentes.

VIII.3.2.5. Límite de cuantificación

Se determinó el límite de cuantificación, analizando 4 muestras de plasma a las que se añadió una concentración conocida de OTC (0.125 µg/ml). Las muestras se sometieron al procedimiento de extracción descrito en el apartado **VIII.3.1.8.** y se calculó la precisión y la exactitud correspondiente a la concentración añadida.

VIII.3.2.6. Límite de detección

Para calcular el límite de detección, se prepararon 20 muestras blancas de cada una de las diferentes matrices estudiadas y se sometieron a los diferentes procesos de extracción descritos para cada uno de los tejidos y el plasma. Las muestras blancas se analizaron por CLAE.

El límite de detección se evaluó según se ha descrito en el apartado **VIII.1.2.2.6.** de este anexo.

VIII.3.2.7. Estabilidad

Para comprobar la estabilidad del analito en las condiciones de almacenamiento de la matriz biológica, se añadió una concentración conocida de OTC a 6 muestras de plasma tejidos y se procedió a la congelación de estas bajo las mismas condiciones que estarían las muestras problema (-80 °C) (ver cuadro 5).

Las muestras fueron descongeladas y analizadas a los 60 días de ser almacenadas.

Cuadro 2. Concentraciones de OTC añadida en el plasma de terneras para la evaluación de la estabilidad.

<i>Plasma</i>	<i>Cantidad de OTC añadida ($\mu\text{g/ml}$)</i>
N= 6	1

VIII.3.3. Material y métodos analíticos en tejidos bovino.**VIII.3.3.1. Reactivos**

- Metanol (Scharlau, calidad CLAE).
- Acetonitrilo (Scharlau, calidad CLAE).
- Acido oxálico (Panreac, para análisis).
- Agua bidestilada.
- Minicolumna de extracción en fase sólida C-18 (100 mg, 1cc, Varian).
- Hidróxido Sódico (Reidel de Haën, calidad CLAE).

VIII.3.3.2. Soluciones

- *Ácido oxálico 0.1 M en metanol:* se pesaron 1.2607 g de ácido oxálico y se añadieron 100 ml de metanol.
- *Ácido oxálico 0.02 M (pH 2.0):* se pesaron 1.2607 g de ácido oxálico y se añadieron 500 ml de agua bidestilada y filtrada. Se llevó a pH 2 con NaOH 1M.
- *Fase móvil:* se mezcló un 80% del ácido oxálico 0.02 M (pH 2) con un 20% de acetonitrilo / metanol (1.5/1).

VIII.3.3.3. Patrones

- OTC dihidrato (SIGMA).
- TC hidrocloreuro (SIGMA).
- 4-EpiOTC (pureza 97%, ACROS).

VIII.3.3.3.1. Preparación de las soluciones patrón**a. Soluciones primarias del patrón**

- 1 mg/ml de OTC: Se pesaron 100 mg de la OTC y se introdujeron en un matraz aforado de 100 ml, se enrasó con acetonitrilo.

- 1 mg/ml de TC: Se pesaron 100 mg de TC y se introdujeron en un matraz aforado de 100 ml, se enrasó con agua bidestilada.
- 1mg/ml de 4-epiOTC: Se pesaron 25.776 mg de 4-epiOTC y se introdujeron en un matraz aforado de 25 ml, se enrasó con metanol.

b. Soluciones secundarias del patrón

- 0.1 mg/ml de OTC, TC y 4-epiOTC: Se tomó, por separado, 1 ml de las soluciones primarias de OTC, TC y 4-epiOTC y se diluyeron con 9 ml de acetonitrilo, agua bidestilada y metanol, respectivamente.
- 0.01 mg/ml de OTC, TC y 4-epiOTC: Se tomaron, por separado, 100 µl de las soluciones primarias de OTC, TC y 4-epiOTC y se diluyeron con 9.9 ml de acetonitrilo, agua bidestilada y metanol, respectivamente.
- 0.001 mg/ml de OTC, TC y 4-epiOTC: se tomaron, por separado, 100 µl de las soluciones secundarias 0.1 mg/ml de OTC, TC y 4-epiOTC y se diluyeron con 9.9 ml de acetonitrilo, agua bidestilada y metanol, respectivamente.

VIII.3.3.4. Material Fungible

- Tubos de plástico de 50 ml.
- Tubos de vidrio conicos de 30 ml.
- Tubos de vidrio para inyector automático. Microviales de 200 µl.
- Pipetas pasteur de vidrio.
- Jeringas de plástico.

VIII.3.3.5. Instrumentación

VIII.3.3.5.1. Equipos usados en la extracción

- Balanza de precisión (Sartorius, Handy H51).
- Centrifuga (Haraeus Sepatech 2.ORS).
- Ultrasonidos (Selecta Mod. 512).
- Agitador horizontal.
- Microjeringas de vidrio (Hamilton, 10, 25, 50,100 µl).

- pHmetro (Gilson).
- Ultraturax (Heidolph, DiAx 900).

VIII.3.3.5.2. Equipos de CLAE

Bomba (Waters 515 CLAE) conectada a un inyector automático (Waters 717 plus), con un detector ultravioleta (Waters 486) y equipado con un sistema informático de recogida de datos (Turbochrom TC6).

La columna fue una ODS-2, 5 μm (4.6 x 200 mm) (Waters).

VIII.3.3.6. Condiciones cromatográficas

- *Fase móvil*: ácido oxálico 0.02 M pH 2 /acetonitrilo/ metanol (80 /12 / 8).
- *Fase estacionaria*: columna de fase reversa ODS-2, 5 μm (4.6 x 200 mm) (Waters).
- *Flujo*: 1.5 ml / min.
- *Detección UV*: $\lambda=355$ nm.

VIII.3.3.7. Preparación de las escalas de calibrado

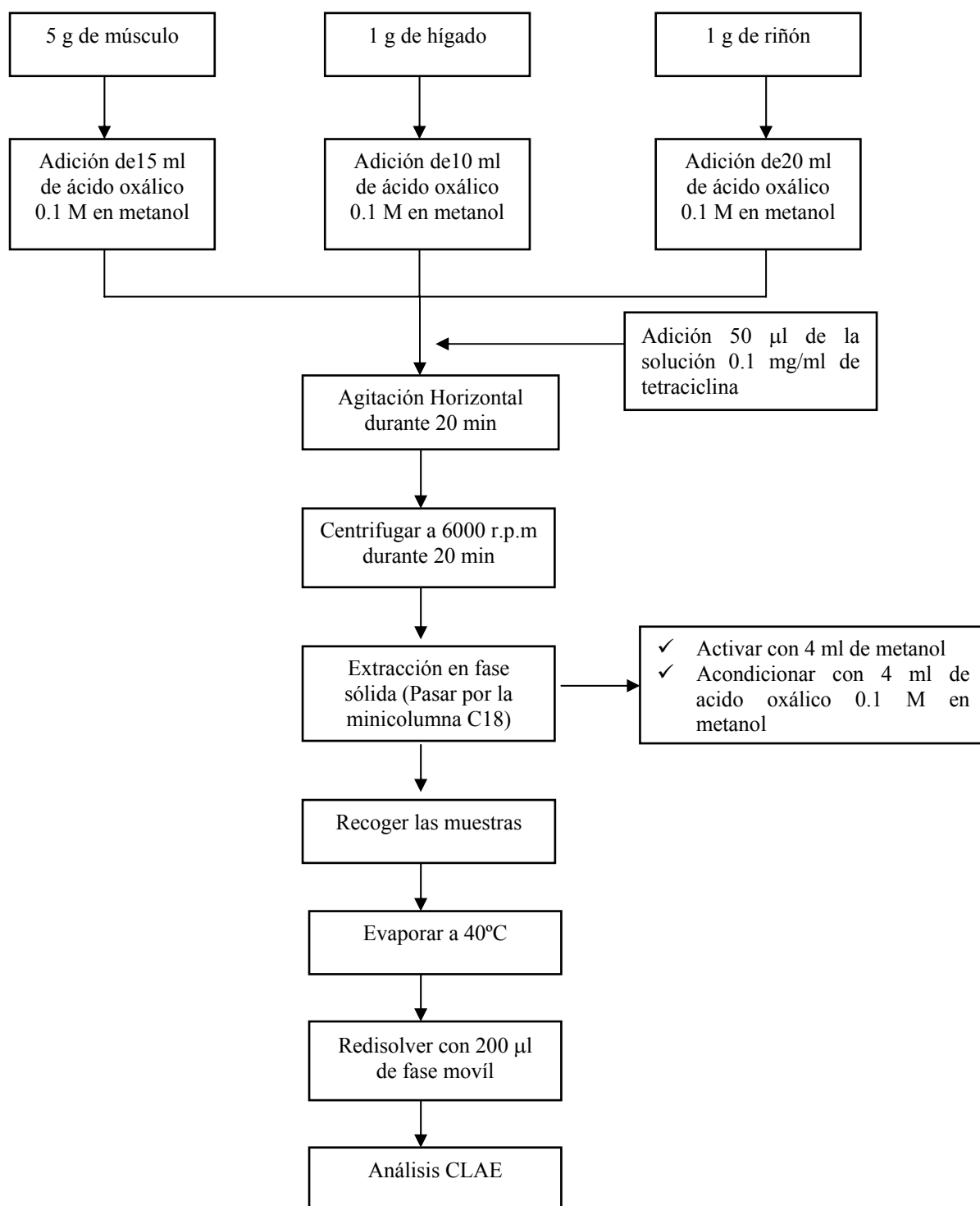
Las escalas de calibración se prepararon añadiendo a 5 g de músculo concentraciones crecientes de OTC + 4-epiOTC de 0.3125, 0.625, 1.25, 1.875 y 2.5 $\mu\text{g/g}$, a 1 g de hígado las concentraciones de 0.1875, 0.375, 0.75, 1.125 y 1.5 $\mu\text{g/g}$ y a 1 g de riñón concentraciones de 0.1875, 0.375, 0.75, 2.5 y 5 $\mu\text{g/g}$ y se añadieron a todos 5 $\mu\text{g/g}$ de TC como patrón interno.

VIII.3.3.8. Preparación del tejido y extracción de la OTC + 4-epiOTC

Tras la descongelación de las muestras de los diferentes tejidos, se pesaron 5 g de tejido para el músculo, y 1 g para el hígado y el riñón. Se colocaron en tubos de vidrio de 30 ml y a cada muestra se adicionó un volumen de 50 μl de la solución 0.1 mg/ml de TC, como patrón interno. Posteriormente, se añadieron 15, 10 y 20 ml de ácido oxálico 0.1 M en metanol a músculo, hígado y riñón, respectivamente, y se agitaron las muestras, horizontalmente, durante 20 min. Se centrifugaron a 6000 r.p.m durante 20 min y el sobrenadante recogido se pasó a través de una columna de extracción en fase sólida de octadecilsilica (activada con 4 ml de metanol y acondicionada con 4 ml de

ácido oxálico en metanol 0.1 M). El eluido resultante se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40 °C. Finalmente, se redisolvieron las muestras en 400 µl de fase móvil para proceder a su análisis por CLAE, según condiciones descritas (ver esquema 2).

Esquema 2. Método analítico para la determinación de la OTC + 4 epiOTC en los tejidos de ternera.



VIII.3.4. Validación del método analítico en tejidos bovino

VIII.3.4.1. Linealidad

El estudio de la linealidad se realizó interdía e intradía en cada uno de los tejidos estudiados en terneros.

VIII.3.4.1.1. Linealidad intradía

Se estudió la linealidad intradía añadiendo a las muestras blancas de cada una de las matrices biológicas a analizar (músculo, riñón e hígado) concentraciones crecientes de OTC y su 4-epímero (ver cuadros 3 a 5) y 50 µl de TC de la solución 0.1 mg/ml, como patrón interno. Paralelamente, se trabajó con blancos de cada uno de los tejidos para comprobar que no aparecía ningún compuesto en el tiempo de retención de la OTC y de su 4-epímero que pudiera interferir en la correcta cuantificación de estos analitos. Las muestras se sometieron al procedimiento de extracción descrito en el apartado VIII.3.3.8 y se analizaron por cuadruplicado dentro del mismo día.

Cuadro 3. Cantidad de OTC y de su 4-epímero añadida a las muestras correspondientes a la recta de calibrado de músculo de ternera.

<i>Punto de la recta</i>	<i>Cantidad de OTC añadida</i>	<i>Cantidad de 4-epiOTC añadida</i>
R₁	25 µl sol 0.01 mg/ml	62.5 µl sol 0.001mg/ml
R₂	50 µl sol 0.01 mg/ml	12.5 µl sol 0.01 mg/ml
R₃	100 µl sol 0.01 mg/ml	25 µl sol 0.01 mg/ml
R₄	15 µl sol 0.1 mg/ml	37.5 µl sol 0.01 mg/ml
R₅	20 µl sol 0.1 mg/ml	50 µl sol 0.01 mg/ml

Cuadro 4. Cantidad de OTC y de su 4-epímero añadida a las muestras correspondientes a la recta de calibrado de riñón de ternera.

<i>Punto de la recta</i>	<i>Cantidad de OTC añadida</i>	<i>Cantidad de 4-epiOTC añadida</i>
R₁	15 µl sol 0.01 mg/ml	37.5 µl sol 0.001mg/ml
R₂	30 µl sol 0.01 mg/ml	75 µl sol 0.001 mg/ml
R₃	60 µl sol 0.01 mg/ml	15 µl sol 0.01 mg/ml
R₄	20 µl sol 0.1 mg/ml	50 µl sol 0.01 mg/ml
R₅	40 µl sol 0.1 mg/ml	100 µl sol 0.01 mg/ml

Cuadro 5. Cantidad de OTC y de su 4-epímero añadida a las muestras correspondientes a la recta de calibrado de hígado de ternera.

<i>Punto de la recta</i>	<i>Cantidad de OTC añadida</i>	<i>Cantidad de 4-epiOTC añadida</i>
R₁	15 µl sol 0.01 mg/ml	37.5 µl sol 0.001mg/ml
R₂	30 µl sol 0.01 mg/ml	75 µl sol 0.001 mg/ml
R₃	60 µl sol 0.01 mg/ml	15 µl sol 0.01 mg/ml
R₄	90 µl sol 0.01 mg/ml	22.5 µl sol 0.01 mg/ml
R₅	12 µl sol 0.1 mg/ml	30 µl sol 0.01 mg/ml

VIII.3.4.1.2. Linealidad interdía

La linealidad interdía se realizó de la misma manera que la linealidad intradía pero las muestras de la recta fueron analizadas en días diferentes.

La linealidad del método, para músculo, hígado y riñón se comprobó mediante análisis de regresión por mínimos cuadrados, representando en ordenados los cocientes de las áreas correspondientes a los picos de OTC + su 4-epímero/ TC y en abscisas las concentraciones de OTC + 4-epímero añadidas.

VIII.3.4.2. Precisión y exactitud**VIII.3.4.2.1. Precisión**

Para calcular la precisión del método, se añadieron a cada uno de los tejidos motivos de este estudio cinco concentraciones diferentes de OTC y de su 4-epímero (las mismas que se añadieron cuando se estudió la linealidad del método y que se han descrito en los cuadros 3, 4 y 5) y se sometieron al proceso de extracción descrito en el apartado **VIII.3.3.8.** Las muestras se analizaron en 4 días diferentes.

La precisión se evaluó como el coeficiente de variación obtenido del análisis de las muestras de las diferentes concentraciones.

VIII.3.4.2.2. Exactitud

La exactitud se evaluó sometiendo muestras libres de analito (blancos), a las cuales se añadieron cinco concentraciones diferentes de OTC y de su 4-epímero (las mismas que se añadieron cuando se estudió la linealidad del método y que se han descrito en los

cuadros 3, 4 y 5) al procedimiento de extracción descrito en el apartado **VIII.3.3.8.** las muestras se analizaron en 4 días diferentes.

La exactitud se expresó como el porcentaje de recuperación, calculado como la diferencia entre la concentración añadida y la observada tras interpolar a una recta de calibrado sometida al procedimiento de extracción.

VIII.3.4.3. Límite de cuantificación

Se determinó el límite de cuantificación, analizando 4 muestras de cada uno de los tejidos a las que se añadió una concentración conocida de OTC + 4-epímero (0.0625 $\mu\text{g/g}$ para músculo y 0.1875 $\mu\text{g/g}$ para hígado y riñón). Las muestras se sometieron al procedimiento de extracción descrito en el apartado **VIII.3.3.8.** y se calculó la precisión (medida como el coeficiente de variación) y exactitud (medida como el porcentaje de recuperación) correspondientes a la concentración añadida.

Cuadro 6. Concentraciones de OTC y de su 4-epímero añadidas a los tejidos analizados.

<i>Tejidos</i>	<i>Concentración de OTC añadida ($\mu\text{g/g}$)</i>	<i>Concentración de 4-epiOTC añadida ($\mu\text{g/g}$)</i>
Músculo	0.05	0.0125
Hígado	0.15	0.0375
Riñón	0.15	0.0375

VIII.3.4.4. Límite de detección

Para calcular el límite de detección, se prepararon 20 muestras blancas de cada una de las diferentes matrices estudiadas y se sometieron a los diferentes procesos de extracción descritos para cada uno de los tejidos. Las muestras blancas se analizaron por CLAE.

El límite de detección se evaluó según se ha descrito en el apartado **VIII.1.2.2.6.** de este anexo.

VIII.3.4.5. Estabilidad

Para comprobar la estabilidad del analito en las condiciones de almacenamiento de la matriz biológica, se añadió una concentración conocida de OTC + 4-epiOTC a 4

muestras de los diferentes tejidos y se procedió a la congelación de éstas bajo las mismas condiciones que estarían las muestras problema (-80 °C) .

Las muestras fueron descongeladas y analizadas a los 60 días de ser almacenadas.

VIII.4. RESULTADOS

VIII.4.1. Validación del método para la determinación de la OTC en plasma de ternera

VIII.4.1.1 Linealidad

VIII.4.1.1.1. Linealidad interdía

Los resultados obtenidos para la linealidad interdía de la OTC en el plasma de ternera muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Linealidad interdía de la OTC en plasma de bovino.

	<i>Ordenada en origen (a)</i>	<i>Pendiente (b)</i>	<i>Coefficiente de correlación (r)</i>
Media ± DE	0.144±0.053	0.334±0.022	0.9965±0.001

Como se puede observar, los resultados obtenidos en la tabla 1, presentan una buena linealidad dentro del rango determinado con un coeficiente de correlación superior a 0.996.

VIII.4.1.1.2. Linealidad intradía

Los resultados obtenidos para la linealidad intradía de la OTC en el plasma bovino se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Linealidad intradía de la OTC en plasma de bovino.

	<i>Ordenada en origen (a)</i>	<i>Pendiente (b)</i>	<i>Coefficiente de correlación (r)</i>
Media ± DE	0.232 ± 0.080	0.373 ± 0.023	0.9982 ± 0.001

Los resultados obtenidos muestran que el método es lineal dentro del rango de 0.25–5 µg/ml, obteniéndose un buen coeficiente de correlación.

VIII.4.1.2. Selectividad y especificidad

Después de analizar las muestras de plasma de ternera blancas y las que contenían OTC y TC se observó que el método no presentaba interferencias cromatográficas en los tiempos de retención correspondientes a los analitos estudiados (**fig 1**).

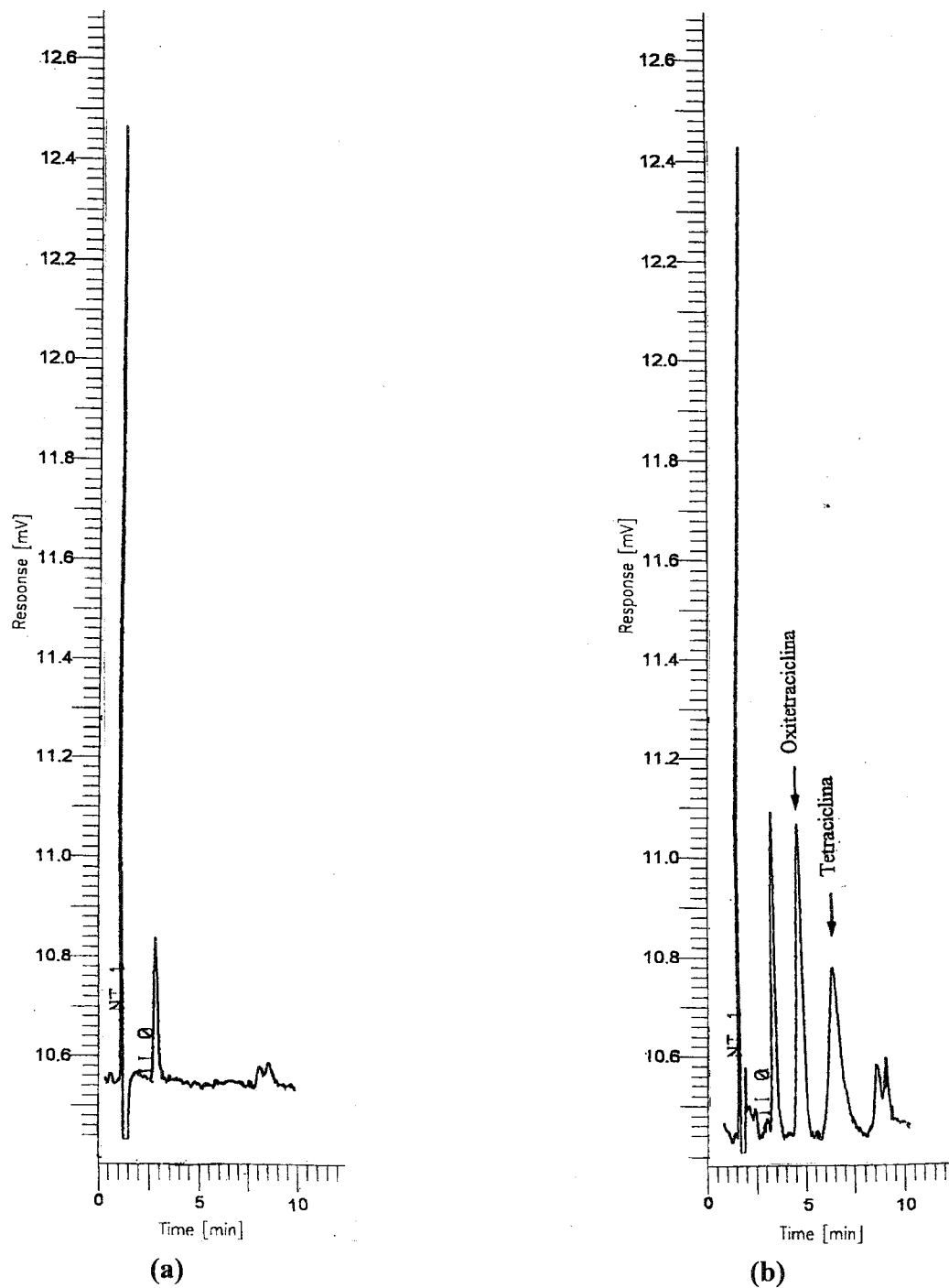


Figura 1: Cromatogramas correspondientes a una muestra de plasma blanco de bovino (a), y a una muestra de plasma de bovino a la que se añadió 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de OTC y 2.5 μg de tetraciclina (b)

VIII.4.1.3. Precisión y exactitud

Los resultados obtenidos de la evaluación de la exactitud y precisión interdía del método desarrollado se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Precisión y exactitud del método de análisis para la determinación de OTC en plasma de bovino.

	<i>Valores teóricos de OTC ($\mu\text{g/ml}$)</i>				
	0.25	0.5	1	2	5
Valores observados de OTC ($\mu\text{g/ml}$)	0.24	0.51	1.00	1.91	5.00
	0.30	0.60	0.69	1.96	5.06
	0.21	0.58	0.90	1.99	5.01
	0.30	0.66	0.74	1.92	5.06
Media \pm DE	0.26 \pm 0.04	0.55 \pm 0.05	0.83 \pm 0.14	1.98 \pm 0.07	5.02 \pm 0.02
CV (%)	15.4	9.0	16.8	3.5	4.0
Recuperación \pm DE	105 \pm 18	113 \pm 13.8	82 \pm 16.9	97 \pm 2	100.6 \pm 0.5

De acuerdo con los resultados expuestos en la tabla 3 se puede concluir que la precisión del método, evaluada a partir de los coeficientes de variación, y según los valores propuestos por Horwitz y también los valores propuestos por Sanco/1805/2000, es correcta.

Los resultados de la exactitud evaluada como el porcentaje de recuperación muestran que el método analítico utilizado tiene una buena recuperación siendo en la mayoría de las concentraciones añadidas próxima al 100 %.

VIII.4.1.4. Límite de cuantificación

Los resultados obtenidos del límite de cuantificación del método de bovino se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Límite de cuantificación de OTC en plasma de bovino.

$\mu\text{g/ml}$ de OTC añadidos	CV (%)	Recuperación \pm DE
0.125	3.62	99.4 \pm 3.6

Como se puede observar en la tabla 4, los resultados obtenidos tras evaluar la precisión y la exactitud de la concentración añadida a través del C.V. y porcentaje de recuperación, estos son adecuados para establecer en la concentración 0.1 µg/ml para el plasma bovino, el límite de cuantificación.

VIII.4.1.5. Límite de detección

Los resultados obtenidos de la evaluación del límite de detección del método se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Límite de detección de OTC en plasma de bovino.

Repuesta (cm)	σ (n=20)	Límite de detección (µg/ml)
0.3	0.0067	0.06

VIII.4.1.6. Estabilidad

En tabla 6 se muestran los resultados de la estabilidad de la OTC en plasma bovino.

Tabla 6. Estabilidad de OTC en plasma de terneros.

Días de almacenamiento	Concentración añadida (µg/ml)	Concentración observada (µg/ml) (n=6)
60	1	0.90±0.2

Los resultados obtenidos en todas las muestras analizadas de estabilidad mostraron una total estabilidad de la oxitetraciclina en el plasma durante 60 días en las condiciones en que las muestras fueron almacenadas.

VIII.4.2. Validación del método analítico para la determinación de OTC + 4 epiOTC en diferentes tejidos de bovino

VIII.4.2.1. Linealidad

VIII.4.2.1.1. Linealidad intradía

En la tabla 7, se muestran los resultados de la linealidad intradía para cada uno de los tejidos para bovino.

Tabla 7. Linealidad intradía para OTC + 4-epímero en cada uno de los tejidos analizados de ternera.

Tejido	Ordenada en el origen (a)	Pendiente (b)	Coefficiente de correlación (r)
Músculo	1.67	1.40	0.9991
	1.67	1.30	0.9910
	1.83	1.49	0.9978
	2.05	1.72	0.9994
Media ± DE	1.79 ± 0.19	1.48 ± 0.18	0.9960 ± 0.003
Hígado	0.02	0.94	0.9940
	0.07	0.64	0.9938
	0.08	0.59	0.9993
	0.32	0.35	0.9872
Media ± DE	0.12 ± 0.13	0.63 ± 0.24	0.9935 ± 0.005
Riñón	0.74	0.67	0.9963
	0.57	0.90	0.9936
	0.77	0.51	0.9960
	0.98	0.64	0.9923
Media ± DE	0.77 ± 0.17	0.68 ± 0.16	0.9945 ± 0.002

Los resultados obtenidos en la tabla 7 muestran que el método analítico es lineal dentro de rango estudiado con un coeficiente de correlación medio de aproximadamente 0.994 para los diferentes tejidos analizados.

VIII.4.2.1.2. Linealidad interdía.

En la tabla 8, se presentan los resultados de la linealidad interdía para los diferentes tejidos para bovino.

Tabla 8. Linealidad inter día para OTC + 4-epímero en cada uno de los diferentes tejidos analizados de ternera.

Tejido	Ordenada en el origen (a)	Pendiente (b)	Coefficiente de correlación (r)
Músculo	1.63	1.40	0.9991
	1.47	2.05	0.9986
	1.53	1.25	0.9974
	0.65	1.18	0.9984
Media ± DE	1.07 ± 0.56	1.47 ± 0.39	0.9983 ± 0.007
Hígado	0.29	1.08	0.9993
	0.25	1.40	0.9988
	0.08	0.59	0.9993
	0.30	1.12	0.9978
Media ± DE	0.22 ± 0.10	1.05 ± 0.33	0.9988 ± 0.0007
Riñón	0.90	0.60	0.9970
	0.57	0.89	0.9936
	0.60	0.68	0.9994
	0.64	0.67	0.9993
Media ± DE	0.68 ± 0.15	0.71 ± 0.13	0.9973 ± 0.003

Los resultados expuestos en la tabla 8 muestran que el método analítico presenta una buena linealidad dentro del rango determinado para los diferentes tejidos analizados con un coeficiente de correlación superior a 0.997.

VIII.4.2.2. Precisión y Exactitud

En las tablas 9 a 11 se presentan los resultados de la precisión y exactitud de los diferentes tejidos diana de ternera.

Tabla 9. Precisión y exactitud del método para la determinación de la OTC + 4-epiOTC en músculo de ternera.

$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC teóricos	$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC observados \pm DE	C.V. (%)	Recuperación (%) \pm DE
0.0625	0.062 \pm 0.004	7.4	99.4 \pm 7.5
0.125	0.153 \pm 0.033	21.5	123.1 \pm 26.9
0.25	0.235 \pm 0.018	7.6	94.4 \pm 7.2
0.375	0.358 \pm 0.023	6.4	95.7 \pm 6.2
0.5	0.50 \pm 0.008	1.6	100.8 \pm 1.6

Tabla 10. Precisión y exactitud del método para la determinación de la OTC + 4-epiOTC en hígado de ternera.

$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC teóricos	$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC observados \pm DE	C.V. (%)	Recuperación (%) \pm DE
0.1875	0.219 \pm 0.010	4.5	117.1 \pm 5.3
0.375	0.335 \pm 0.034	10	89.3 \pm 9.2
0.75	0.754 \pm 0.007	0.9	100.6 \pm 0.9
1.125	1.087 \pm 0.154	14	96.6 \pm 13.7
1.5	1.482 \pm 0.04	2.8	98.8 \pm 2.8

Tabla 11. Precisión y exactitud del método para la determinación de la OTC + 4-epiOTC en riñón de ternera.

$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC teóricos	$\mu\text{g/g}$ de la OTC + 4-epiOTC observados \pm DE	C.V. (%)	Recuperación (%) \pm DE
0.1875	0.148 \pm 0.032	21	87.9 \pm 21.7
0.375	0.416 \pm 0.052	12.6	103.6 \pm 8.5
0.75	0.825 \pm 0.138	16.8	104.3 \pm 17.6
2.5	2.46 \pm 0.204	8	102.5 \pm 1.7
5	5.00 \pm 0.085	1.7	100.1 \pm 1.7

Los resultados presentados en las tablas 9, 10 y 11 muestran que la precisión y exactitud del método analítico, evaluada a partir del coeficiente de variación y del porcentaje de recuperación según los valores determinados por la UE (Sanco/1805/2000) Según Sanco el

valor de C.V. no debe superar 23 % a las concentraciones $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ y a 16 % a las concentraciones $\geq 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$, son correctas.

VIII.4.2.3. Límite de cuantificación

En la tabla 12, se presentan los resultados del límite de cuantificación de ternera.

Tabla 12. Límite de cuantificación del método para la determinación de la OTC + 4-epiOTC en tejidos de ternera.

<i>Tejidos</i>	<i>$\mu\text{g}/\text{g}$ de OTC +4-epiOTC Añadida</i>	<i>C.V. (%)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Músculo	0.0625	7.4	99.4 ± 7.5
Hígado	0.1875	4.5	117.1 ± 5.3
Riñón	0.1875	21.0	87.9 ± 21.7

Puede observarse de los resultados obtenidos del CV y el porcentaje de recuperación que el límite de cuantificación para cada uno de los tejidos estudiados, se puede establecer en $0.0625 \mu\text{g}/\text{g}$, $0.1875 \mu\text{g}/\text{g}$ y $0.1875 \mu\text{g}/\text{g}$ para músculo, hígado y riñón, respectivamente.

VIII.4.2.4. Límite de detección

En la tabla 13, se presentan los resultados del límite de detección obtenidos en ternera, en los tejidos analizados.

Tabla 13. Límite de detección de OTC + 4-epiOTC obtenido en los diferentes tejidos de ternera.

<i>Tejidos</i>	<i>Respuesta (cm) (n =20)</i>	<i>Límite Detección ($\mu\text{g}/\text{g}$)</i>
Músculo	0.2	0.03
Hígado	0.2	0.07
Riñón	0.2	0.08

VIII.4.2.5. Especificidad

La especificidad del método, evaluada a partir de la comparación de muestras a las que se añadió una concentración conocida de la OTC + 4-epiOTC y TC, con blancos de la misma

matriz, muestra que no aparecía ningún pico en el mismo tiempo de retención que los analitos estudiados (ver figuras 2 a 4).

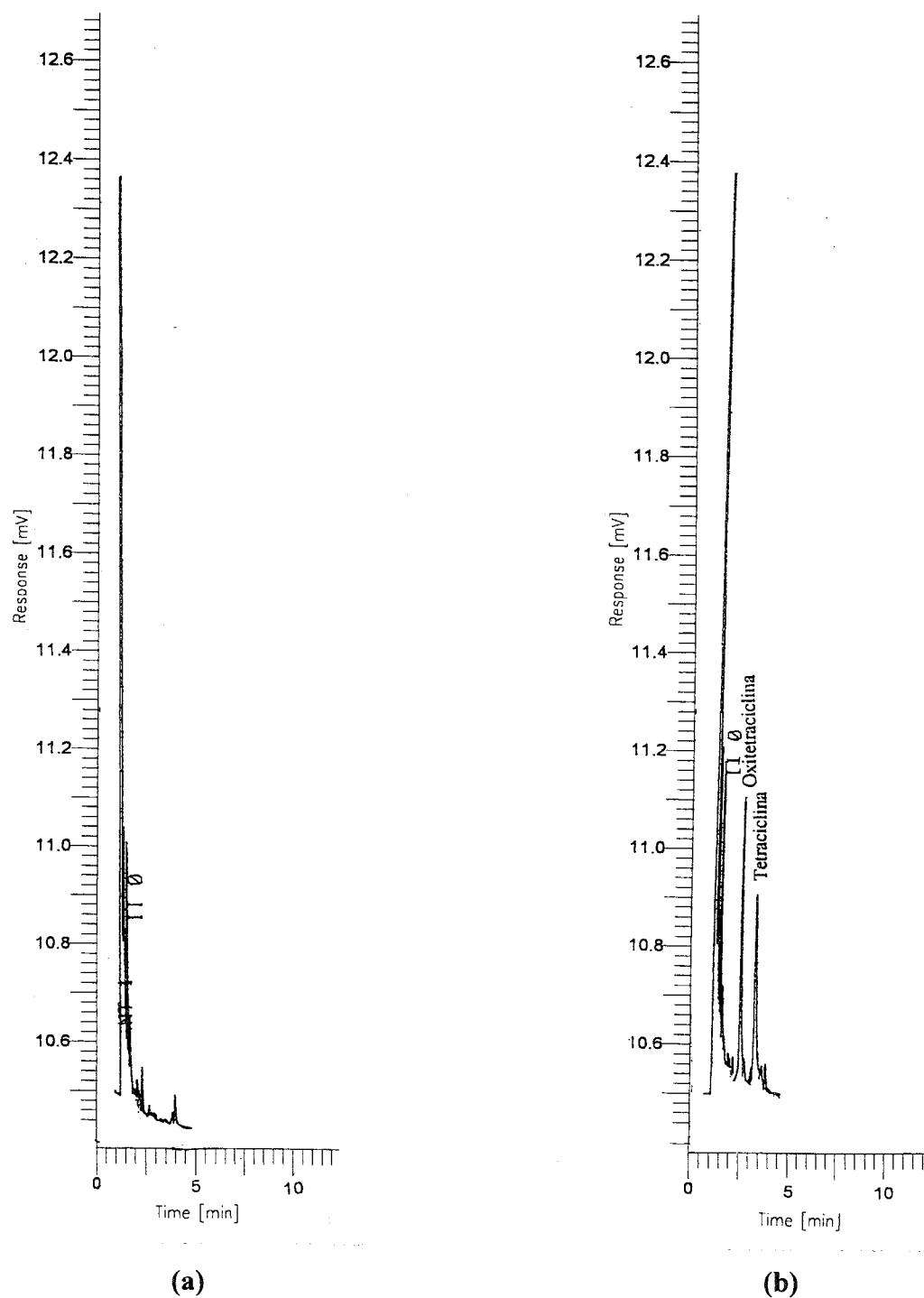


Figura 2. Cromatogramas correspondientes a una muestra de músculo blanco de ternera (a) y a una muestra a la que se añadieron 0.25 $\mu\text{g/g}$ de OTC + 4-epiOTC y 5 μg de tetraciclina (b).

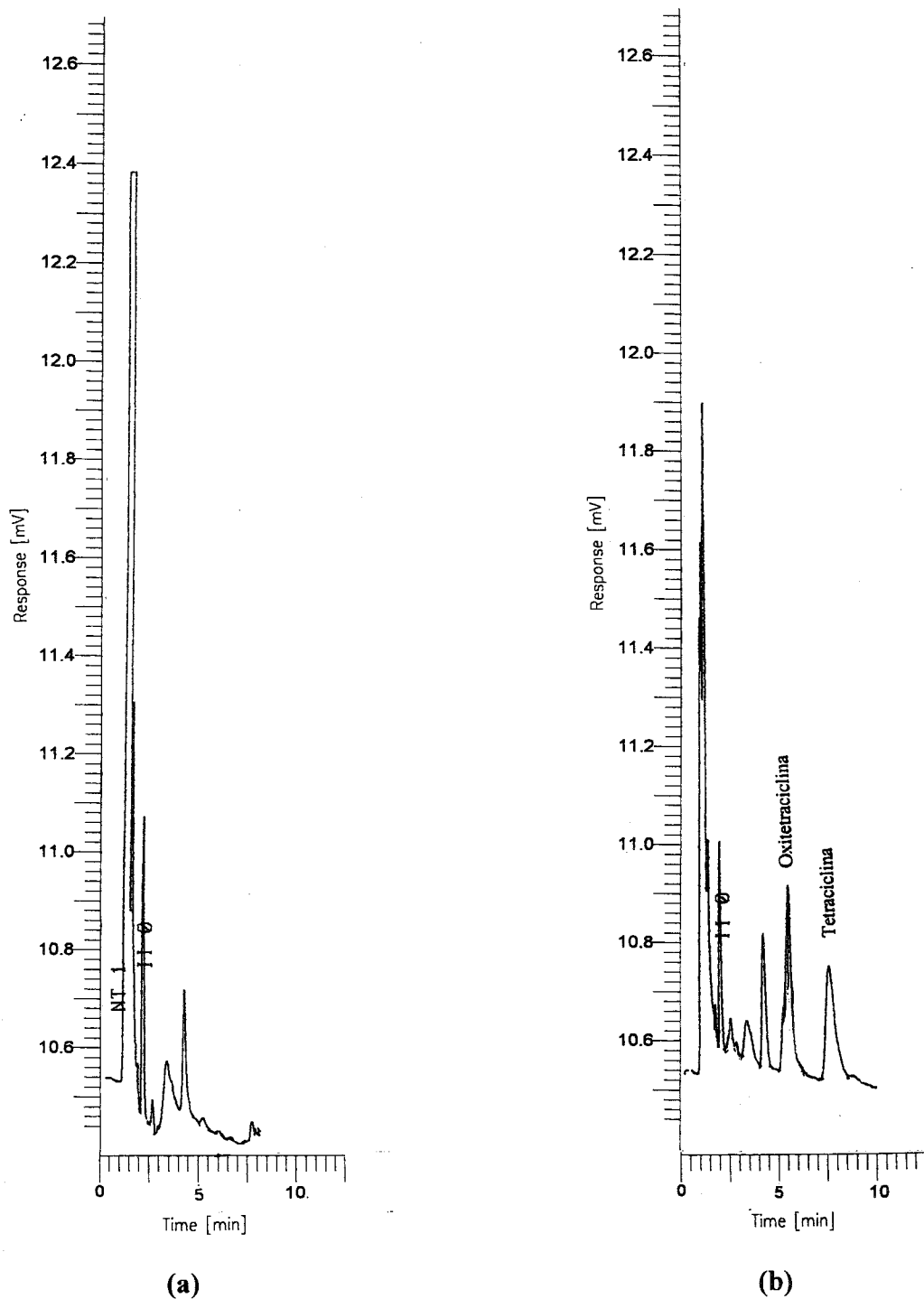


Figura 3. Cromatogramas correspondientes a una muestra de hígado blanco de ternera (a) y a una muestra a la que se añadieron 0.75 µg/g de OTC + 4-epiOTC y 5 µg de tetraciclina (b).

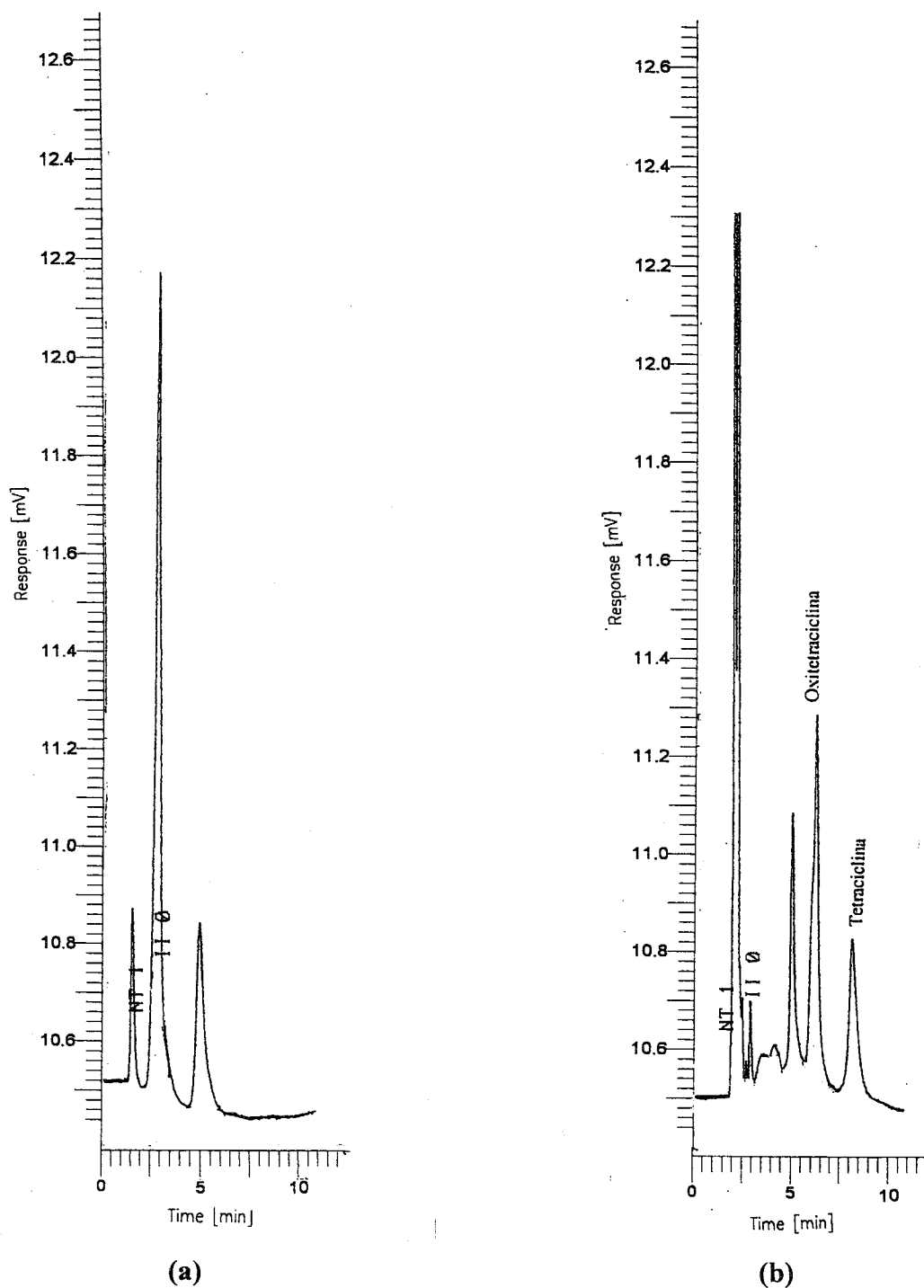


Figura 4. Cromatogramas correspondientes a una muestra de riñón blanco de ternera (a) y a una muestra a la que se añadieron 0.75 $\mu\text{g/g}$ de OTC + 4-epiOTC y 5 μg de tetraciclina (b).

VIII.4.2.7. Estabilidad

En la tabla 14 se muestran los resultados de la estabilidad de la OTC + 4-epiOTC en los diferentes tejidos.

Tabla 14. Estabilidad de OTC + 4-epiOTC en los diferentes tejidos analizados de ternera según las condiciones de almacenamiento durante 60 días (n=4).

<i>Tejido</i>	<i>Concentración añadida ($\mu\text{g/g}$)</i>	<i>Concentración observada ($\mu\text{g/g}$) \pm DE</i>
Músculo	0.25	0.25 \pm 0.018
Hígado	0.75	0.74 \pm 0.185
Riñón	0.75	0.75 \pm 0.110

Los resultados obtenidos en todos los tejidos mostraron una correcta estabilidad de la OTC + 4-epiOTC durante los 60 días de almacenamiento en las condiciones descritas.

-

