



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Farmacocinética y Farmacodinamia de tildipirosina
en Medicina Veterinaria.

D. Juan Sebastian Galecio Naranjo
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Farmacocinética y Farmacodinamia de tildipirosina en
Medicina Veterinaria.

Autor: D. Juan Sebastian Galecio Naranjo.

Directores: D.^a Elisa Escudero Pastor
D. Pedro Marín Carrillo.



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D. Juan Sebastian Galecio Naranjo

doctorando del Programa de Doctorado en

Integración y Modulación en señales en Biomedicina

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Farmacocinética y Farmacodinamia de tildipirosina en Medicina Veterinaria.

y dirigida por,

Dña. Elisa Escudero Pastor

D. Pedro Marín Carrillo

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Quito, a 29 de mayo de 2023

Fdo.: Juan Sebastián Galecio Naranjo

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Con amor infinito para mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis directores del doctorado, Elisa Escudero y Pedro Marín, quienes me apoyaron incansablemente durante todas las fases experimentales de los proyectos de investigación, elaboración de los artículos y seguimiento durante el proceso de redacción de la tesis doctoral. Queridos directores les agradezco infinitamente por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por confiar en mi durante estos años como su estudiante de doctorado, y por darme las herramientas para desarrollarme como investigador. Por último, queridos Pedro y Elisa les agradezco por ser buenos amigos y seres humanos, jamás estuve lejos de mi país, gracias por hacerme sentir en casa y en familia.

Además, deseo agradecer a todos los colaboradores de las diversas investigaciones realizadas de quienes pude contar de sus valiosos aportes, así como su invaluable ayuda en la publicación de los artículos que componen esta tesis.

Mis más sinceros agradecimientos a Verónica Hernandis, colega del laboratorio de Farmacología, compañera del doctorado, quien generosamente compartió sus amplios conocimientos en Química, los cuales fueron plasmados en los artículos de las técnicas analíticas. Mil gracias querida Vero, fuiste un pilar importantísimo en los ensayos cromatográficos, diversas actividades en el laboratorio y redacción de artículos de las técnicas cromatográficas.

De igual manera, deseo agradecer a José Joaquín Cerón por su ayuda desinteresada en los análisis de laboratorio, los cuales nos permitió confirmar que la aplicación del antibiótico era seguro para los animales.

Un especial reconocimiento a Juan Carlos Corrales, Christian de la Fe, Edgar García-Romero, excelentes microbiólogos de la Universidad de Murcia, quienes me ayudaron con varios de los análisis bacteriológicos.

Con gran cariño deseo agradecer a Miguel Ángel Cajas, quien me ayudo incansablemente en los muestreos de las ovejas y cabras, quien además me dio la oportunidad de experimentar y sentir la vida del campo español.

A Santiago Lidón le agradezco infinitamente por brindarnos su ayuda con la disposición de sus caballos, además de las distintas facilidades durante los experimentos.

Un especial agradecimiento para Casilda Rodríguez y Arantxa Isla, quienes me abrieron las puertas de sus laboratorios en Madrid y Vitoria para incursionar en las bases de la simulación estadística en la integración de parámetros farmacocinéticos–farmacodinámicos.

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin los animales que conformaron mis grupos experimentales. Realmente anhelo que los resultados de mis experimentos nos permitan evitar el sufrimiento animal ocasionado por las enfermedades infecciosas que los aquejan.

Un especial agradecimiento para Juan Torres, quien estuvo siempre dispuesto a escucharme y con quien conté con palabras de apoyo y aliento. Realmente mil gracias por estar preocupado por mi bienestar durante mi estadía en España.

Por último, deseo agradecer a la Fundación Carolina - España y a la Universidad San Francisco de Quito por la beca ofrecida para realizar mis estudios doctorales.

ABREVIATURAS

AUC₀₋₂₄: Área bajo la curva de concentración-tiempo desde el momento cero hasta las veinticuatro horas.

AUC_{0-∞}: Área bajo la curva de concentración-tiempo desde el momento cero hasta el infinito.

Cl: Aclaramiento plasmático

C_{max}: Concentración máxima

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMI₅₀: Concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento del cincuenta por ciento de los aislados.

CMI₉₀: Concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento del noventa por ciento de los aislados.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

F: Biodisponibilidad

h: horas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IM: Intramuscular

IV: Intravenoso

MRT: Tiempo de residencia medio

MAT: Tiempo de absorción medio

SC: Subcutáneo

t_{max}: Tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima

t_{1/2z}: Vida media de eliminación o semivida

UV: Ultravioleta

V_{ss}: Volumen de distribución en estado estacionario

V_z: Volumen de distribución

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

El presente manuscrito tiene como título “Farmacocinética y Farmacodinamia de tildipirosina en Medicina Veterinaria” corresponde a un compendio de siete (7) publicaciones realizadas en revistas con indexación en Scopus, Journal Citations Reports (JCR) y Scimago Journal & Country Rank (SJR), junto con el visto bueno de la Comisión General de Doctorado de la Escuela Internacional de Doctorado y el informe favorable de la Comisión Académica del Doctorado en Integración y Modulación en Señales en Biomedicina de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia – España.

Las citas de cada una de las publicaciones que constituyen esta tesis doctoral se presentan a continuación:

1. **Juan Sebastián Galecio**, Verónica Hernandis, Elisa Escudero y Pedro Marín (2022). Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Association*, 72 (4) 4905–4912. <https://doi.org/10.12681/jhvms.28300>
2. **Juan Sebastián Galecio**, Verónica Hernandis, Elisa Escudero y Pedro Marín (2022). Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma. *Acta Veterinaria-Beograd*, 72(1), 100-110 <https://doi.org/10.2478/acve-2022-0008>
3. **Juan Sebastián Galecio**, Elisa Escudero, José Joaquín Cerón, Giuseppe Crescenzo y Pedro Marín (2020). Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration. *Animals*, 10 (Antibiotic Use in Animals), 1-9. <https://doi.org/10.3390/ani10081332>
4. **Juan Sebastián Galecio**, Elisa Escudero, Elena Badillo y Pedro Marín (2022). Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage. *Research in Veterinary Science*, 152, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.06.033>

5. **Juan Sebastián Galecio**, Pedro Marín, Verónica Hernandis, María Botia y Elisa Escudero (2022). Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats. *Pharmaceutics*, 14(860). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040860>
6. **Juan Sebastian Galecio**, Elisa Escudero, Juan Carlos Corrales, Edgar García-Romero, Christian de la Fe, Verónica Hernandis y Pedro Marín (2022). Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the *in vitro* potency of current macrolides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2022) 38:221. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03407-0>
7. **Juan Sebastian Galecio**, Elena Badillo, Elisa Escudero, Juan Carlos Corrales, María Teresa Yuste, Pedro Marín (2023). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep with fibrinous pneumonia. *Acta Veterinaria-Beograd*. 73(2).

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN	12
4. REVISION DE LITERATURA.....	16
4.1.- Aspectos generales de los macrólidos	17
4.1.1.- Estructura química	17
4.1.2.- Clasificación de los macrólidos	18
4.1.3.- Mecanismo de acción.....	19
4.1.4.- Efecto post-antibiótico	21
4.1.5.- Efecto inmunomodulador y antiinflamatorio	21
4.1.6.- Actividad antibacteriana de los macrólidos en Veterinaria.....	22
4.1.7.- Indicciones terapéuticas de los macrólidos	22
4.1.8.- Mecanismos de resistencia bacteriana a los macrólidos	25
4.2.- Propiedades farmacocinéticas generales de los macrólidos.....	26
4.2.1.- Absorción y biodisponibilidad	27
4.2.2.- Distribución tisular y humoral	29
4.2.3.- Vida media y conjugación proteica.....	30
4.2.4.- Metabolismo	30
4.2.5.- Excreción	31
4.2.6.- Interacciones farmacológicas	31
4.2.7.- Toxicidad y efectos adversos	32
4.3.- Tildipirosina	33
4.3.1.- Estructura	34
4.3.2.- Mecanismo de acción y espectro de actividad	34
4.3.3.- Farmacocinética de tildipirosina en distintas especies animales.....	35
4.3.4.- Reacciones adversas y toxicidad.....	38
4.4.- Bibliografía	39
5. OBJETIVOS DE LA TESIS	51
5.1.- Objetivo general	52
5.2.- Objetivos específicos	52
6. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	53

7. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS.....	62
7.1.- Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk.....	63
7.2.- Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma.	64
7.3.- Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration.	65
7.4.- Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage.	66
7.5.- Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats.	67
7.6.- Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the in vitro potency of current macrolides.	68
7.7.- Antimicrobial susceptibility of <i>Pasteurella multocida</i> isolated from sheep with fibrinous pneumonia.....	70
7.8.- Aportaciones del doctorando en las publicaciones	71
8. COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL	75
8.1.- Determination of Tildipirosin in horse plasma using HPLC.....	76
8.2.- Effect of serum on the in vitro activity of gamithromycin against <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from mastitis in goats.	77
8.3.- Pharmacokinetics of tildipirosin after intravenous administration to horses and evaluation of its potential cardiotoxic effect.....	78
9. CONCLUSIONES	79
10. CONCLUSIONS.....	82
11. APENDICES.....	85
11.1.- Estancias de investigación	86
11.2.- Formación docente e investigativa.....	88
11.3.- Becas y reconocimientos.....	89

1. RESUMEN

La resistencia bacteriana es un fenómeno de selección natural que ocurre cuando bacterias expuestas a la acción de los antibióticos, desarrollan mutaciones que les permiten sobrevivir a futuras exposiciones. Este fenómeno puede desencadenar graves repercusiones en la población humana, animal y el medio ambiente en su conjunto, cuando estas bacterias resistentes producen enfermedades que ya no pueden ser tratadas o controladas con los antibióticos de manera efectiva, pudiendo provocar serios impactos en la salud pública y la economía global. Por tanto, la resistencia a los antibióticos es una problemática que requiere esfuerzos multidisciplinarios que fomenten la optimización y el uso racional de los antimicrobianos a todos los niveles en donde éstos son utilizados. Los estudios farmacocinéticos permiten conocer la disposición de estos fármacos en el organismo, permitiendo describir su comportamiento a través del tiempo, conocer las concentraciones que alcanzarían en las diferentes biofases y su tiempo de permanencia en el lugar de la infección. En Medicina Veterinaria, estos estudios son imprescindibles, ya que el comportamiento farmacocinético difiere dependiendo de múltiples factores, como la especie animal, ruta de administración o el estado fisiológico, entre otros, los cuales van a influir en el diseño de la pauta posológica en una especie animal dada. Además, es fundamental establecer la susceptibilidad de los agentes bacterianos frente a los antibióticos de interés, con el objetivo de ser integrados con los parámetros farmacocinéticos para proponer una pauta posológica adecuada y eficaz que minimice el riesgo de aparición de microorganismos resistentes. Por tanto, el objetivo general de la presente tesis doctoral es determinar la farmacocinética y farmacodinamia de tildipirosina en pequeños rumiantes y caballos.

Previo a cualquier estudio farmacocinético, es fundamental validar las técnicas analíticas para la cuantificación de las concentraciones exactas del fármaco en las diferentes matrices biológicas, que permitan el adecuado cálculo de los parámetros farmacocinéticos. En la presente tesis doctoral se validaron dos métodos analíticos para la cuantificación de tildipirosina mediante HPLC con detector de ultravioleta (HPLC-UV), uno en leche de cabra y otro en plasma de caballo. En la técnica utilizada con leche de cabra, se empleó la precipitación de proteínas con acetonitrilo ya que es la técnica más sencilla de ejecutar y no requiere equipos sofisticados. El método analítico desarrollado presentó una adecuada sensibilidad, un alto porcentaje de extracción de tildipirosina desde esta matriz, alta linealidad, así como una reducción del tiempo de ejecución del procedimiento en comparación con otras técnicas publicadas en la literatura. Sin embargo, esta

técnica aún presentaba algunos inconvenientes relacionados con la presencia de compuestos endógenos, que en otras matrices biológicas podrían producir interferencias con la tildipirosina o con el estándar interno empleado. La técnica, además, presentaba elevados tiempos de evaporación del acetonitrilo, lo cual limitaba el número de muestras procesadas por día.

Con el objetivo de resolver los problemas anteriormente indicados, se procedió a desarrollar una técnica para la cuantificación de tildipirosina en plasma de caballos mediante el procedimiento de extracción líquido-líquido con dietiléter y la modificación del pH del medio. Este método demostró cualidades similares a la técnica de precipitación de proteínas con acetonitrilo en cuanto a su linealidad, alto nivel de extracción y similar sensibilidad analítica. Pero, además, la modificación proporcionó una ausencia casi completa de compuestos endógenos y un menor tiempo de procesamiento de las muestras durante la evaporación del solvente y del tiempo de análisis cromatográfico. Por tanto, al comparar las dos técnicas analíticas, se puede señalar que ambas técnicas son útiles en la cuantificación de tildipirosina en las diferentes matrices biológicas, son técnicas sencillas y rápidas de ejecutar y precisan un bajo costo de materiales para su ejecución. Sin embargo, el método extracción líquido-líquido con modificación del pH es muy superior en cuanto al tiempo de procesamiento y análisis de las muestras, siendo su principal cualidad la ausencia de compuestos endógenos lo que permite la reducción de errores durante la cuantificación de tildipirosina.

Para el estudio de la disposición de la tildipirosina en cabras (en periodo de lactación), ovejas y caballos, se realizaron tres experimentos independientes, en donde se seleccionaron animales clínicamente sanos, distribuidos al azar en los distintos grupos experimentales. Se utilizó un estudio cruzado con un periodo de descanso de 60 días para el experimento realizado con cabras, y de 30 días para el experimento en caballos y ovejas. Los tratamientos consistieron en la administración de tildipirosina por vía IV (2 mg/kg), IM (4 mg/kg) y SC (4 mg/kg), obteniéndose muestras sanguíneas a diferentes tiempos. Además, en el caso de las cabras, se obtuvieron muestras de leche tras la administración de tildipirosina para su cuantificación en esta matriz, así como para la cuantificación de las concentraciones intracelulares de tildipirosina en células somáticas. Paralelamente a estos estudios, se obtuvieron muestras sanguíneas independientes para evaluar analitos asociados a daño muscular e inflamación. Clínicamente, se evaluó cualquier reacción

adversa o lesión local generada por la administración del macrólido en las distintas especies animales en estudio.

La disposición de tildipirosina en ovejas, cabras y caballos estuvo caracterizada por una rápida absorción tanto por la vía intramuscular como subcutánea. Sin embargo, al comparar ambas vías extravasculares, se pudo observar que la tildipirosina administrada por vía intramuscular alcanzaba una concentración máxima (C_{max}) significativamente superior (0,58-1,26 $\mu\text{g/L}$) y en un menor tiempo (t_{max} 0,6-1,1h) que los valores obtenidos por vía subcutánea (C_{max} 0,58-0,65 $\mu\text{g/L}$ y t_{max} 2,3-2,6 h). La biodisponibilidad de tildipirosina en caballos y cabras posterior a su administración IM y SC fue completa (107-118%), a diferencia de lo registrado en ovejas en donde su biodisponibilidad fue moderada para ambas vías parenterales (68-79 %).

Tildipirosina presentó una extensa distribución en caballos, ovejas y cabras con valores de V_z entre 3,3 a 7,2 L/kg. En este sentido, se registraron concentraciones muy superiores de tildipirosina en leche de cabra y células somáticas de cabras en relación al plasma, indicando una extensa difusión de este antibiótico hacia compartimientos periféricos. La C_{max} de tildipirosina en leche fue de 40 a 45 veces superior a las registradas en plasma. De igual forma, la C_{max} de tildipirosina en células somáticas fue de 22 a 26 veces las encontradas en plasma. La distribución de los macrólidos también ocurre en los fluidos de recubrimiento epitelial del sistema respiratorio y macrófagos pulmonares, por lo cual se puede presumir que tildipirosina se debe distribuir extensamente hacia esos fluidos y células en las especies estudiadas, pero son necesarios estudios adicionales que comprueben esta aseveración.

El aclaramiento plasmático calculado en cabras fue marcadamente superior (0,63 L/h/kg) al registrado en ovejas y caballos (0,21 a 0,22 L/h/kg). Esta diferencia puede deberse a que las cabras durante la lactación disponen de la vía mamaria como ruta accesoria de eliminación del antibiótico. Esta observación concuerda al comparar los datos de vida media ($t_{1/2z}$) plasmática de tildipirosina entre las distintas especies de los experimentos, en cabras fueron significativamente inferiores tanto por vía IV, IM y SC (6,2-8,6 h) en relación a las registrada en ovejas y caballos (13-43 h), ratificando el hecho que en cabras lecheras la vía mamaria es una importante ruta para la eliminación de tildipirosina del organismo. Paralelamente, se estableció una amplia acumulación de tildipirosina en la glándula mamaria, en donde el área bajo la curva de concentración ($AUC_{0-\infty}$)

de tildipirosina en leche y células somáticas fue > 55 y 75 veces, respectivamente, a las determinadas en el plasma. Esta condición se ve reflejada en una extensa $t_{1/2z}$ (70-105 h) de tildipirosina en leche y células somáticas, requiriéndose un periodo de supresión de al menos 45 días para no detectar residuos del antibiótico en leche.

La administración de tildipirosina por vía IV, IM y SC en ovejas, cabras y caballos no se asoció con reacciones adversas generalizadas. No obstante, la administración intramuscular de tildipirosina provocó una leve miolisis en todas las especies estudiadas, que se resolvió espontáneamente dentro de las 24 a 48 horas posterior a la aplicación del macrólido por vía IM. Sólo en el caso de los caballos se estableció un leve proceso inflamatorio en el punto de aplicación IM, siendo detectable clínicamente durante 48 horas. Por tanto, se puede afirmar que la administración de tildipirosina por las vías de administración estudiadas en ovejas cabras y caballos es segura.

La sensibilidad antibacteriana de patógenos comúnmente asociados a mastitis en cabras (*Staphylococcus coagulasa negativos*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp* y *Mycoplasma agalactiae*), así como de neumonía fibrinosa en ovejas (*Pasteurella multocida*) frente a tildipirosina, gamitromicina, danofloxacino y oxitetraciclina se determinó siguiendo las condiciones del CLSI. Paralelamente se evaluó el efecto de la suplementación con suero caprino u ovino al medio de cultivo bacteriano sobre la potencia de esos antibióticos.

Bajo condiciones estándar (CLSI), todas las bacterias asociadas a mastitis en cabras fueron altamente susceptibles a danofloxacino. En cambio, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp* fueron menos sensibles a gamitromicina y tildipirosina ($\text{CMI}_{90} > 128 \mu\text{g/L}$), probablemente por mecanismos asociados a la resistencia a los macrólidos, o a que el caldo de cultivo tradicional fue inapropiado para que estos antibióticos pudieran actuar adecuadamente contra esas bacterias. *Mycoplasma agalactiae* fue muy sensible a danofloxacino y oxitetraciclina a diferencia de tildipirosina y gamitromicina (valores de $\text{CMI}_{90} > 16 \mu\text{g/L}$). Por su parte, *Pasteurella multocida* fue muy sensible a tildipirosina y en segundo término a gamitromicina y danofloxacino. Sin embargo, un alto número de cepas de *Pasteurella multocida* presentaron valores extremadamente altos de CMI frente a oxitetraciclina, probablemente por el desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana.

Al adicionar suero caprino u ovino al medio de cultivo la potencia de tildipirosina y gamitromicina aumentó significativamente contra los patógenos asociados a mastitis en cabras o neumonía en ovejas. Por su parte, danofloxacino, no tuvo variaciones en potencia frente a los distintos patógenos de mastitis en cabras, pero si se incrementó significativamente su actividad frente a *Pasteurella multocida* cuando se adiciono suero ovino. Por último, oxitetraciclina disminuyó significativamente su potencia frente a la mayoría de los patógenos de mastitis en cabras o no presentó fluctuaciones con la adición de suero ovino frente a *Pasteurella multocida*.

En relación a lo demostrado en los estudios de susceptibilidad bacteriana se puede indicar que la tildipirosina debería ser analizada bajo condiciones similares o semejantes a las encontradas en el lugar de la infección, lo que permite estimar con más certeza la susceptibilidad real de los agentes patógenos en condiciones *in vivo*.

2. SUMMARY

Antibiotic resistance is a natural selection phenomenon that occurs when bacteria exposed to antibiotics develop mutations that enable them to survive future exposures. This phenomenon can have severe consequences on the health of human and animal populations, as well as the environment as a whole. When resistant bacteria cause diseases that can no longer be effectively treated or controlled with antibiotics, it can significantly impact public health and the global economy. Therefore, addressing antibiotic resistance requires multidisciplinary efforts to promote the optimization and rational use of antimicrobials at all levels of their application. Pharmacokinetic studies play a crucial role in understanding how drugs are processed in the body. These studies describe the behavior of antibiotics over time, their concentration levels in different biofluids, and their duration at the infection site. In Veterinary Medicine, these studies are essential because the pharmacokinetic behavior varies depending on factors such as animal species, route of administration, and physiological status, among others. These factors influence the design of appropriate dosage regimens for specific animal species. Additionally, it is essential to determine the susceptibility of bacterial agents to the antibiotics of interest, integrating this information with pharmacokinetic parameters to propose effective dosage regimens that minimize the risk of emergence of resistant microorganisms. Therefore, the primary objective of this doctoral thesis is to investigate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tildipirosin in small ruminants and horses.

Before conducting any pharmacokinetic study, it is crucial to validate the analytical techniques for accurately quantifying drug concentrations in various biological matrices. This validation ensures the accurate calculation of pharmacokinetic parameters. This doctoral thesis validated two analytical methods for quantifying tildipirosin using HPLC with an ultraviolet detector (HPLC-UV). One method was developed for quantification in goat milk, while the other was designed for horse plasma. The technique employed for goat milk involved protein precipitation using acetonitrile, since it is a simple technique to perform and does not require sophisticated equipment. The developed analytical method exhibited satisfactory sensitivity, a high percentage of tildipirosin extraction from the goat milk matrix, excellent linearity, and a reduced execution time of the procedure compared to other techniques described in the literature. However, this technique still had certain limitations associated with endogenous compounds. In other biological matrix, these compounds could interfere with the accurate measurement of

tildipirosin or the internal standard used. Moreover, the acetonitrile evaporation process in this technique was time-consuming, which constrained the number of samples that could be processed per day.

In order to address the issues mentioned above, the liquid-liquid extraction method with diethyl ether and pH modification of the medium was developed to quantify tildipirosin in horse plasma. The results of this method exhibited similar characteristics to the protein precipitation technique using acetonitrile, including linearity, high extraction efficiency, and comparable analytical sensitivity. Moreover, the modification significantly reduced endogenous compounds and improved processing time for sample evaporation and chromatographic analysis. When comparing these two analytical techniques, both prove to be valuable for quantifying tildipirosin in various biological matrixes. They are straightforward and time-efficient methods that require minimal material costs for implementation. However, the liquid-liquid extraction method with pH modification excels in terms of sample processing and analysis time. Its primary advantage lies in the absence of endogenous compounds, which contributes to minimizing errors while quantifying tildipirosin.

Three separate experiments were conducted to investigate tildipirosin disposition in lactating goats, sheep, and horses. Clinically healthy animals were randomly assigned to various experimental groups. A crossover design was implemented, with a 60-day washout period for the goat experiment and a 30-day period for horse and sheep experiments. The treatment regimens included the administration of tildipirosin IV (2 mg/kg), IM (4 mg/kg), and SC (4 mg/kg), with blood samples collected at different predetermined times. In the case of goats, milk samples were also obtained after tildipirosin administration for quantification in this matrix, as well as for assessing intracellular tildipirosin concentrations in milk somatic cells. Simultaneously, independent blood samples were collected to evaluate muscle damage and inflammation markers. Clinically, any adverse reactions or local injuries resulting from administering the macrolide in the different animal species under investigation were carefully assessed.

The disposition of tildipirosin in sheep, goats, and horses is characterized by rapid absorption, both intramuscularly and subcutaneously. However, a comparison between the two routes reveals that intramuscular administration leads to significantly higher peak concentration

(C_{\max}) levels (0.58-1.26 $\mu\text{g/L}$) and a shorter time to reach maximum concentration (t_{\max} 0.6-1.1 h) compared to subcutaneous administration (C_{\max} 0.58-0.65 $\mu\text{g/L}$ and t_{\max} 2.3-2.6 h). The bioavailability of tildipirosin in horses and goats following intramuscular and subcutaneous administration is complete (107-118%), whereas in sheep, it is moderate for both parenteral routes (68-79%). Tildipirosin exhibits extensive distribution in horses, sheep, and goats, with a volume of distribution (V_z) ranging from 3.3 to 7.2 L/kg. Remarkably higher concentrations of tildipirosin are found in milk and somatic cells compared to plasma, indicating substantial diffusion of this antibiotic into peripheral compartments. The C_{\max} of tildipirosin in milk is 40 to 45 times higher than in plasma, while it is 22 to 26 times higher in somatic cells. It is also noteworthy that macrolides distribute in the epithelial lining fluids of the respiratory system and pulmonary macrophages, suggesting the extensive distribution of tildipirosin in these fluids and cells in sheep and horses. However, further studies are required to confirm this assumption.

Plasma clearance in goats was significantly higher (0.63 L/h/kg) than in sheep and horses (0.21 to 0.22 L/h/kg). This difference can be attributed to the fact that lactating goats have the mammary route as an additional pathway for eliminating the antibiotic. This observation is consistent when comparing the plasma half-life ($t_{1/2z}$) of tildipirosin among the different species in the experiments. In goats, the half-life was significantly shorter for the IV, IM, and SC routes (6.2-8.6 h) compared to those observed in sheep and horses (13-43 h), confirming that in dairy goats, the mammary route plays a crucial role in tildipirosin elimination from the body. Furthermore, there was a substantial accumulation of tildipirosin in the mammary gland, with the area under the concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$) of tildipirosin in milk and somatic cells being more than 55 and 75 times higher, respectively, than that in plasma. Prolonged half-lives (70-105 h) of tildipirosin in milk and somatic cells will need a withdrawal period of at least 45 days to ensure no residues of tildipirosin are detected in milk.

The administration of tildipirosin via IV, IM, and SC routes in sheep, goats, and horses did not lead to generalized adverse reactions. However, intramuscular administration of tildipirosin caused mild myolysis in all studied species, which was resolved spontaneously within 24 to 48 hours after the IM application of the macrolide. Only in the case of horses, a mild inflammatory process was observed at the IM administration site, clinically detectable for 48 hours. Therefore,

it can be concluded that the administration of tildipirosin after the studied routes in sheep, goats, and horses is safe.

The bacterial sensitivity of pathogens commonly associated with mastitis in goats (coagulase-negative *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp, and *Mycoplasma agalactiae*) as well as fibrinous pneumonia in sheep (*Pasteurella multocida*) to tildipirosin, gamithromycin, danofloxacin, and oxytetracycline was determined following the conditions of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Additionally, the effect of supplementation with goat or sheep serum to the bacterial culture medium on the potency of these antibiotics was also evaluated.

Under standard conditions (CLSI), all bacteria associated with mastitis in goats were highly susceptible to danofloxacin. In contrast, coagulase-negative *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus* spp were less sensitive to gamithromycin and tildipirosin (MIC₉₀ > 128 µg/L), possibly due to mechanisms associated with macrolide resistance or because the traditional culture broth was inadequate for these antibiotics to act effectively against these bacteria. *Mycoplasma agalactiae* was highly sensitive to danofloxacin and oxytetracycline, unlike tildipirosin and gamithromycin (MIC₉₀ values >16 µg/L). On the other hand, *Pasteurella multocida* was highly sensitive to tildipirosin and, to a lesser extent, to gamithromycin and danofloxacin. However, a high number of *Pasteurella multocida* strains showed extremely high MIC values for oxytetracycline, likely due to the development of bacterial resistance mechanisms.

When goat or sheep serum was added to the culture medium, the potency of tildipirosin and gamithromycin significantly increased against pathogens associated with mastitis in goats or pneumonia in sheep. On the other hand, danofloxacin showed no variations in potency against the different mastitis pathogens in goats, but its activity significantly increased against *Pasteurella multocida* when sheep serum was added. Lastly, oxytetracycline significantly decreased potency against most goats' mastitis pathogens or showed no fluctuations when sheep serum was added against *Pasteurella multocida*. Based on the demonstrated results of bacterial susceptibility studies, it can be indicated that tildipirosin should be analyzed under similar or comparable conditions to those found at the site of infection. These conditions allow for a more accurate estimation of the natural susceptibility of the pathogens under in vivo conditions.

3. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas capaces de inhibir el crecimiento bacteriano o producir su muerte. Para obtener este efecto las bacterias deben ser expuestas por suficiente tiempo y en adecuadas concentraciones del antibiótico en el sitio donde ocurre una infección ¹. En la actualidad, los antibióticos son considerados un “bien” para la humanidad, pues han permitido mantener la salud en las poblaciones humanas y animales. Este estado de *bienestar* se ha conseguido gracias a la utilización de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, además de la prevención de la diseminación de patógenos hacia el ambiente y poblaciones humanas y animales ².

La resistencia bacteriana es un fenómeno de selección natural que se produce cuando bacterias expuestas a los antibióticos generan mutaciones que les permite sobrevivir a futuras exposiciones ¹. Esta capacidad de resistencia es una característica que puede ser trasmisible desde las bacterias resistentes hacia bacterias sensibles de su misma especie o hacia diferentes especies de bacterias ^{3,4}. En la actualidad, existen información alarmante que identifica alrededor de 100 especies bacterianas con resistencias a los antibióticos ⁵, siendo esta condición extremadamente dinámica, la cual puede empeorar si gobiernos e instituciones públicas no comprometen recursos económicos y políticas públicas que permitan abordar esta problemática de manera urgente. Al respecto, se estima que en un futuro próximo la resistencia a los antibióticos puede convertirse en una de las principales amenazas para la salud pública y la economía a nivel mundial ⁶. El impacto que tiene la resistencia bacteriana sobre la salud pública se traduce en la presentación de enfermedades infecciosas sin opción a tratamientos efectivos, alto riesgo en la diseminación de enfermedades infecciosas en la población y muerte de personas, entre otras ⁷. Al respecto, se ha estimado que las bacterias resistentes causaron la muerte directa de 1.700.000 de personas en el año 2019 ⁵, y se piensa que, de no existir cambios en las conductas asociadas al inadecuado uso de antibióticos, las bacterias resistentes serían la principal causa de muerte para el 2050, con cerca de 10.000.000 decesos por año ⁸, pasando a ser la principal causa de muerte en humanos por encima de la cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares e inclusive el cáncer ⁹.

Por otro lado, las repercusiones en la economía global podrían ser muy graves, en especial en países de renta baja, en donde millones de personas podrían pasar a la pobreza extrema. En este sentido, el Banco Mundial realizó varias simulaciones, considerando dos tipos de escenarios, tanto

optimistas y pesimistas en cuanto al control de la resistencia a los antibióticos con proyección al año 2050. En la publicación se establece que en ambos escenarios existiría una disminución en el producto interno bruto global de 1,1% a 3,8% respectivamente, correspondiendo a pérdidas estimadas de entre 2 a 6 trillones de dólares anuales. Estas pérdidas estarían relacionadas a los altos costos de tratamiento y hospitalización de pacientes afectados por infecciones causadas por gérmenes resistentes, junto con pérdida de mano de obra especializada por baja médica o muerte. Además, el sector ganadero podría tener pérdidas muy sensibles debido a la disminución en su productividad, así como también, por una depresión del comercio internacional, como consecuencia de barreras sanitarias impuestas por países que limiten la entrada de productos desde países con problemas de resistencia a los antimicrobianos en sus territorios ⁶.

Existen diferentes causas que explican la aparición de las bacterias resistentes, siendo el uso de antibióticos sin prescripción médica la principal causa en la población humana ¹⁰, junto con la suspensión prematura de tratamientos con antibióticos, y la administración de estos fármacos sin previo cultivo y/o antibiograma ¹¹. La ganadería es otra fuente importante de bacterias resistentes, siendo el sector en donde se consume el mayor volumen de antibióticos a nivel mundial, con cerca de 93.000 toneladas registradas en el año 2017, destinándose su consumo principalmente para animales de producción tanto terrestres como acuáticos ¹². El uso de los antibióticos en la ganadería se puede dirigir con fines terapéuticos, profilácticos, metafilácticos, o como promotores de crecimiento, prácticas que mantienen una presión constante sobre las bacterias animales, acelerando el proceso natural de selección de mutantes resistentes, posibilitando la generación y transmisión de bacterias resistencias hacia diversos ambientes, infinidad de animales y población humana ⁷. Cabe destacar que en las últimas décadas varios países ya no contemplan el uso de antibióticos como promotores de crecimiento como ocurre en la Unión Europea y Estados Unidos de Norte América, en donde está completamente prohibido su utilización para fines productivos ¹³⁻¹⁵.

Se establece que no solo el inadecuado uso de antibióticos puede generar la aparición de resistencias de forma directa, sino también las desigualdades sociales al acceso de servicios sanitarios y veterinarios, en donde poblaciones desatendidas tienen un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas propiciando el uso inevitable de antibióticos ¹⁶. Al respecto, las precarias prácticas de higienización (acceso al agua), bioseguridad, ausencia de medidas de prevención y

control de enfermedades infecciosas en centros de atención médica, comunidades, sistemas de producción y granjas de animales, junto con la falta de acceso a vacunas o métodos de diagnóstico, se indican como los principales factores de riesgo en la generación de bacterias resistentes. Además, otro factor preocupante corresponde a la ausencia de procesos que garanticen la efectividad y calidad de los antibióticos que van a ser utilizados en humanos y animales, exponiendo a la población a tratamientos ineficaces con la consecuente subexposición de las bacterias a los antibióticos y riesgo de aparición de resistencias ¹². El origen y las fuentes de exposición de bacterias resistentes en animales, humanos y medio ambiente se puede visualizar en la Figura 1.

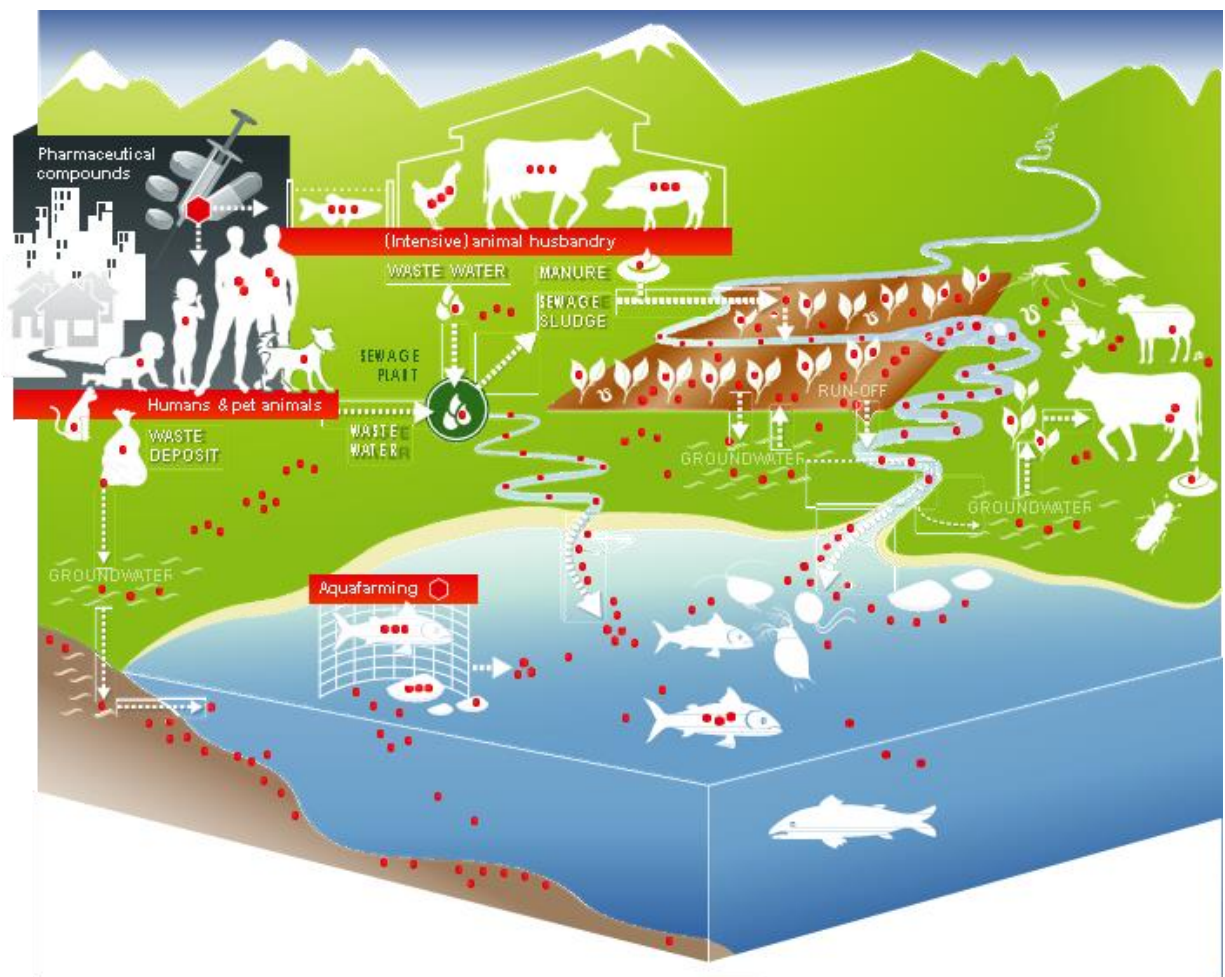


Figura 1. Fuentes de exposición a los antibióticos para humanos, animales y el medio ambiente

4. REVISION DE LITERATURA

4.1.- Aspectos generales de los macrólidos

Los macrólidos son una extensa familia de antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas^{18,19} y biopelículas bacterianas²⁰. Se utilizan tanto en medicina humana como en veterinaria, principalmente para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas que afectan al sistema respiratorio^{21,22}. En la Unión Europea los macrólidos se encuentran clasificados dentro de la categoría C, es decir antibióticos para su uso con precaución en Veterinaria^{22,23}. Por lo tanto, su administración debe reservarse para tratar infecciones específicas, en donde existan pocas o ninguna otra alternativa terapéutica o se haya demostrado que antibióticos de primera línea, es decir antibióticos de la categoría D o antibióticos denominados de uso prudente, no son efectivos para el tratamiento de la infección^{2,23}.

Los macrólidos poseen actividad bacteriostática, aunque bajo algunas circunstancias como son: tamaño del inóculo, agente infeccioso involucrado, susceptibilidad bacteriana, entre otras, también pueden ejercer un efecto bactericida^{18,24}. En Veterinaria se utilizan principalmente con fines terapéuticos o metafilácticos²⁵. No obstante, solían utilizarse como promotores de crecimiento²⁴, debido al hecho que podían mejorar el rendimiento productivo de los animales²⁶.

Sin embargo, por la creciente y preocupante problemática de la resistencia a los antibióticos, que puede tener serias repercusiones sobre la salud humana y animal, su utilización actualmente se encuentra terminantemente prohibida para fines productivos en la Unión Europea, así como en los Estados Unidos^{13,14}. Considerando los principales usos de los macrólidos, en la actualidad estos representan el 10,4% del consumo total de antibióticos a nivel mundial¹². Este substancial e importante consumo se debe a que estos antibióticos son una herramienta importante en el control y prevención de variadas enfermedades en Veterinaria, permitiendo reducir significativamente tanto la morbilidad como la mortalidad de animales de granja²⁷⁻³¹, así como en animales menores o de compañía.

4.1.1.- Estructura química

La estructura clásica de los macrólidos corresponde a un *macro* anillo lactónico conformado por 12 a 16 átomos de carbono, del cual se unen uno o varios azúcares mediante enlaces O-glucídicos a su estructura. De acuerdo con el número de carbonos del anillo, los

macrólidos pueden ser clasificados en miembros de 12, 14, 15 y 16 carbonos. Cuando azúcares neutros o básicos sustituyen uno, dos o tres grupos hidroxilo del anillo lactona, les confiere un carácter básico a la molécula, confiriéndole una mayor actividad biológica ³². La estructura química general de los distintos miembros de los macrólidos, en base al número de carbonos se presenta en la figura 2.

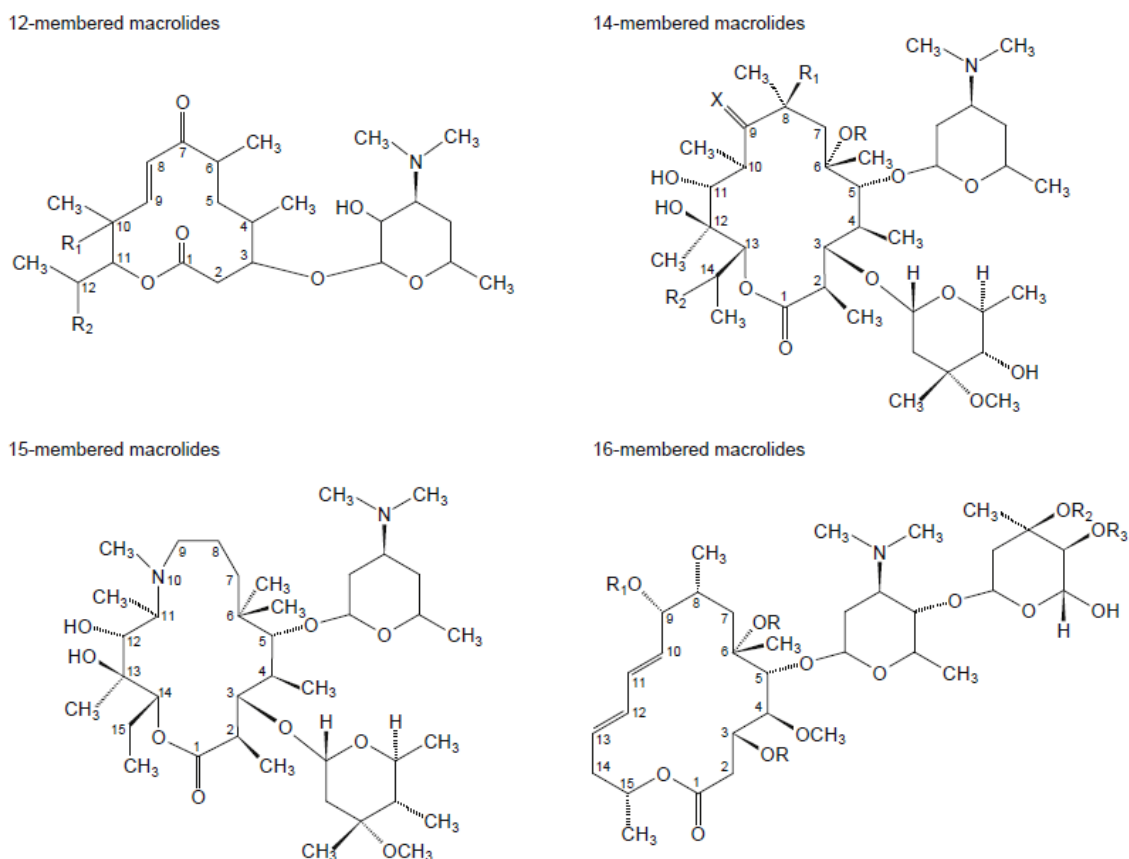


Figura 2. Estructura química de los macrólidos ³³.

4.1.2.- Clasificación de los macrólidos

Esta familia de antibióticos se puede clasificar en macrólidos de primera, segunda y tercera generación. Al respecto, todos los macrólidos de primera generación o también denominados macrólidos naturales son derivados de *Streptomyces* spp. Sus principales representantes son eritromicina y tilosina, siendo los precursores de la mayoría de macrólidos semisintéticos ³⁴. Por su parte, los macrólidos de segunda generación son el producto de esterificaciones, formación de

sales a partir de los macrólidos naturales o mediante modificaciones estructurales ³⁵, siendo sus principales representantes y aprobados para su uso en veterinaria, claritromicina, azitromicina, tildipirosina, tulatromicina, gamitromicina y tilmicosina ^{19,33}. Por último, los macrólidos de tercera generación o ketolidos, corresponden a miembros semisintéticos que se originan a partir de la eritromicina, por el reemplazo de su azúcar por un grupo cetona ³³. Se utilizan principalmente en neumonías donde los β -lactámicos hayan sido ineficaces o en donde se ha demostrado serios riesgos de efectos adversos asociados a la administración de fluoroquinolonas ³⁶, siendo únicamente telitromicina reportada para su uso en caballos ³⁷. En la Tabla 1 se presenta la clasificación, estructura y origen de los diferentes macrólidos.

Tabla 1. Clasificación, estructura y fuentes de los principales macrólidos.

Macrólidos	Generación	Natural o semisintético	Numero de átomos*	Fuente natural o derivados y síntesis.
Eritromicina	Primera	Natural	14	<i>Streptomyces erytheus</i>
Tilosina	Primera	Natural	16	<i>Streptomyces fradiae</i>
Claritromicina	Segunda	Semisintético	14	Derivado de eritromicina. 6-O Metil-eritromicina Alquilación del grupo hidroxyl en la posición C-6.
Azitromicina	Segunda	Semisintético	15	Sustitución de un nitrógeno y adición de un methyl por sustitución en la posición C-9.
Tulatromicina	Segunda	Semisintético	15	Derivado de azitromicina.
Gamitromicina	Segunda	Semisintético	15	Derivado de eritromicina.
Tildipirosina	Segunda	Semisintético	16	Derivado de tilosina. Incorporación de dos piperidinas y una micaminosa en C-5.
Tilmicosina	Segunda	Semisintético	16	Derivado de tilosina.
Telitromicina	Tercera	Semisintético	14	Derivado de eritromicina. Con remplazo de L-cardinosa por un grupo 3-cetona

*Anillo lactona.

4.1.3.- Mecanismo de acción

Los macrólidos poseen dos mecanismos de acción asociados a su actividad antibacteriana, siendo la inhibición en la síntesis de proteínas bacterianas el principal mecanismo de acción. En cambio, solo para algunos macrólidos se asocia su capacidad de inhibición de biopelículas bacterianas como mecanismo secundario de acción antibacteriana ³³. Son catalogados como antibióticos bacteriostáticos, aunque dependiendo del tipo de agente infeccioso involucrado, la susceptibilidad bacteriana del agente infeccioso, el tamaño del inóculo, así como si existe una alta concentración del macrólido en el lugar de la infección, pueden ejercer un efecto bactericida ^{18,24}.

Por lo tanto, su administración debe ser adecuadamente analizada por parte del veterinario en base a la condición clínica del animal, tipo de infección presente y estado inmunitario del animal ³⁸.

El mecanismo de acción clásico de los macrólidos corresponde a su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas bacterianas, mediante una unión reversible al RNA ribosomal 23S en la subunidad 50S de los ribosomas de las células procariotas ejerciendo su acción antibacteriana ^{24,39}. Esta unión provoca la detención de los procesos de transpeptidación y traslocación, causando la separación prematura de una cadena polipeptídica incompleta, impidiéndole ejercer su actividad fisiológica en los procesos vitales para las bacterias ⁴⁰. Al respecto, la efectividad antibacteriana de tildipirosina, tulatromicina, tilosina y tilmicosina se asocia a la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas, con similar magnitud de efectividad entre estos macrólidos ⁴¹. Aunque este mecanismo no es específico para los macrólidos, existen otros antibióticos como son las lincosamidas, oxazolidinonas y estreptograminas que también pueden interactuar en el mismo sitio de unión, aunque cada uno de ellos con distintas afinidades ⁴². Cabe mencionar que la afinidad de los macrólidos por su sitio de unión puede disminuir, si existen modificaciones estructurales en los ribosomas, fenómeno relacionando normalmente a mutaciones bacterianas ⁴¹.

Las biopelículas son una matriz de exopolisacáridos que permite a un conjunto de bacterias desarrollarse en condiciones adversas, evadiendo la exposición a los antibióticos y permaneciendo adheridos a una superficie inerte o tejido vivo ²⁰. Los exopolisacáridos son sintetizados únicamente por bacterias que tienen la capacidad de formar biopelículas, debido a la presencia de vías enzimáticas necesarias para sintetizar dichos exopolisacáridos ⁴³. En muchos de los casos se ha establecido que el macrólido no ejerce ningún efecto antibacteriano *per se* sobre las bacterias productoras de biopelículas, pero sí ejerce una acción permisiva sobre otro antibiótico que pueda ser coadministrado con él. Al respecto el macrólido tiene la capacidad de modificar las condiciones de la biopelícula bacteriana aportando condiciones óptimas para que el antibiótico coadministrado pueda ejercer su acción antibacteriana ⁴⁴⁻⁴⁷. Se establece que los macrólidos de 14 y 15 carbonos poseen capacidad de inhibir las biopelículas bacteriana, en donde azitromicina, claritromicina han demostrado niveles interesantes de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, a diferencia de tilosina que no posee esta cualidad ^{44-46,48}. Los mecanismos implicados en la inhibición de biopelículas bacterianas por parte de los macrólidos están asociados a la inhibición de diversas vías enzimáticas

encargadas de la formación de exopolisacáridos bacterianos, disminuyendo así la viscosidad del exopolisacárido o su biosíntesis, permitiendo posteriormente la adecuada exposición de las bacterias a los antibióticos coadministrados con los macrólidos⁴⁸ o exponiendo a las bacterias a condiciones del medio externo que le pueden ser desfavorables para su supervivencia y multiplicación⁴⁹.

4.1.4.- Efecto post-antibiótico

Dentro de las características farmacodinámicas de los macrólidos, se encuentra su capacidad de suprimir el crecimiento bacteriano en ausencia de concentraciones eficaces en el sitio de infección o cuando sus concentraciones se encuentran por debajo de la CMI posterior a una amplia exposición antibiótica⁵⁰. La duración del efecto post-antibiótico está principalmente determinado por la especie bacteriana que provoca la infección, así como la naturaleza y la concentración del antibiótico en el sitio de infección. No obstante, existen otros factores que condicionan el tiempo de supresión del crecimiento bacteriano como son la temperatura, pH, pO₂, medio de cultivo y tipo de fluido corporal^{51,52}. Los macrólidos poseen un efecto post-antibiótico preferentemente hacia bacterias Gram-positivas³⁸, en donde se establece, en general, una supresión del crecimiento bacteriano durante aproximadamente 3 h^{50,53-56}.

No obstante, la relevancia clínica del efecto post-antibiótico de los macrólidos de última generación obtenidas en condiciones *in vitro* es bastante discutible cuando es comparado el comportamiento de los macrólidos *in-vivo*, en donde sus concentraciones disminuyen gradualmente en el tiempo a consecuencia de sus prolongadas $t_{1/2z}$, condición que no se asemeja a las condiciones estándar del laboratorio para la estimación del efecto post-antibiótico, en donde son retirados los antibióticos del medio de forma abrupta^{52,57}. Con respecto a lo anterior, y con relación a las características farmacocinéticas de los macrólidos de última generación, probablemente este efecto no tenga una relevancia clínica tan significativa⁵⁷.

4.1.5.- Efecto inmunomodulador y antiinflamatorio

Además de las propiedades antibacterianas de los macrólidos, también poseen efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, que son de utilidad en el tratamiento de enfermedades respiratorias crónicas en humanos⁵⁸ tales como fibrosis quística, asma y enfermedad pulmonar

obstructiva crónica^{59,60}. Entre los principales mecanismos moleculares mediante los cuales los macrólidos cumplen con estas funciones se pueden incluir la modulación de la liberación de citoquinas proinflamatorias y anti-inflamatorias, disminución en la expresión de moléculas de adhesión en procesos de marginación de neutrófilos, así como la inhibición del estrés oxidativo derivado de la desgranulación de neutrófilos con formación de radicales libres^{61,62}. Sin embargo, existen pocas referencias que demuestren su uso con estos fines terapéuticos en animales⁶³⁻⁶⁵, por lo que su uso en Medicina Veterinaria se encuentra principalmente orientado a su actividad como agentes antimicrobianos.

4.1.6.- Actividad antibacteriana de los macrólidos en Veterinaria

Los macrólidos son una familia de antibióticos utilizados para el tratamiento de varios tipos de patógenos asociados a graves enfermedades, y al igual que otros antibióticos como fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, son antimicrobianos de importancia crítica en el control de enfermedades infecciosas en humanos y animales^{2,57,66}. Los macrólidos poseen un espectro de actividad frente a bacterias que incluyen cocos y bacilos Gram-positivos aerobios, así como bacilos Gram-negativos aerobios, y algunos anaerobios. Dentro de las principales bacterias Gram-positivas con sensibilidad a los macrólidos se encuentran *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Arcanobacterium pyogenes*. En cambio, dentro de las bacterias Gram-negativas sensibles a los macrólidos se incluyen *Actinobacillus pleuroneomoniae*, *Histophilus somni*, *Manhemia haemolitica*, *Pasteurella multocida* y *Campilobacter* spp, así como bacterias anaerobias tales como *Brachyspira* spp, *Fusobacterium* spp, *Bacteroides* spp y *Clostridium* spp. Cabe destacar que los macrólidos no son activos contra bacilos Gram-negativos aerobios entéricos. Sin embargo, los macrólidos tienen acción frente a importantes bacterias intracelulares o atípicas tales como *Lawsonia* spp, *Mycoplasma* spp, *Chlamydia* spp, *Bordetella* spp, *Moraxella* spp y *Leptospira* spp y *Spirocheta* spp⁵⁷.

4.1.7.- Indicaciones terapéuticas de los macrólidos.

Los macrólidos pueden ser usados con fines terapéuticos o de manera controlada y restringida como metafilácticos^{12,25}. En pequeñas especies y caballos, preferentemente se utiliza la vía oral para su administración. En cambio, en animales de granja las vías más frecuentes de

administración son la intramuscular o subcutánea con fines terapéuticos, y en el alimento o agua de bebida con fines metafilácticos siguiendo las recomendaciones y normativas de las entidades regulatorias ^{14,15}.

Su uso con fines terapéuticos está dirigido principalmente al tratamiento de diversas infecciones del sistema respiratorio ^{33,67}, ocasionadas por bacterias tales como *Rhodococcus equi*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Bibersteinia trehalosi*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Histophilus somni*, entre otras ⁶⁸⁻⁷¹, como también en neumonías causadas por *Streptococcus* spp. en donde exista sospecha de reacciones alérgicas a los β -lactámicos ⁷². Asimismo, se utilizan en el tratamiento de enfermedades causadas por *Lawsonia intracelularis*, como son la enteropatía hemorrágica del cerdo y la enfermedad proliferativa intestinal en equinos ^{73,74}, y en infecciones causadas por distintas especies de micoplasmas ^{75,76}.

En cuanto a su uso como agentes metafilácticos, han sido utilizados principalmente en la prevención del síndrome respiratorio bovino ⁷⁷⁻⁷⁹. Su administración se efectúa posterior al transporte de los animales que presenten un alto riesgo de presentar el síndrome respiratorio ^{78,79}, siendo tildipirosina y tulatromicina los más usados con este cometido dentro del grupo farmacológico ^{28,78,79}. Lamentablemente, en animales de producción los macrólidos aún siguen siendo utilizados como promotores del crecimiento en 42 países que se encuentran en los continentes Americano, Africano y Asiático ¹², siendo incorporados en el alimento o agua de bebida de los animales, con el objetivo de mejorar su rendimiento, modificar su microbiota, el metabolismo lipídico y el energético ^{80,81}, así como también, prevenir la formación de abscesos hepáticos originados por *Fusobacterium necrophorum* especialmente en bovinos ^{2,82}. Otros macrólidos que comúnmente se utilizaron junto con el alimento o el agua de bebida corresponden a tilvalosina en el tratamiento o metafilaxis de la enteropatía proliferativa porcina, la neumonía enzoótica porcina y la disentería de los cerdos ⁶⁶ y tilmicosina en el tratamiento y prevención de neumonía en lechones ⁸³. No obstante, hay que tomar en consideración que la administración de alimento medicado con fines metafilácticos, se encuentra altamente regulado en la Unión Europea desde el año 2019, en donde existen estrictas restricciones para su administración ^{15,84}. Las dosis de los distintos macrólidos, así como la vía de administración y sus intervalos de administración en las distintas especies domesticas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Dosis, vía e intervalo de administración de macrólidos en animales domésticos ²⁴.

Especie	Macrólido	Dosis	Vía	Intervalo	
Perros/gatos	Eritromicina	10-20 mg/kg	PO	8-12 h	
	Claritromicina	5-10 mg/kg	PO	12 h	
	Azitromicina	5 mg/kg (gatos), 10 mg/kg (perros)	PO	24 h	
	Tilosina	5-10 mg/kg	IM	12 h	
Rumiantes	Eritromicina	1,1-2,2 mg/kg	IM	24 h	
	Tilosina	4-10 mg/kg	IM	24 h	
	Tilmicosina	10 mg/kg	SC	Dosis única	
	Tulatromicina	2,5 mg/kg	SC	Dosis única	
	Gamitromicina	6 mg/kg	SC	Dosis única	
	Tildipirosina	4 mg/kg	SC	Dosis única	
	Caballos	Eritromicina	25 mg/kg	PO	6-8 h
	Eritromicina	5 mg/kg	IV	6 h	
	Claritromicina	7.5 mg/kg	PO	12 h	
	Azitromicina	10 mg/kg	PO, IV*	24-48 h	
Cerdos	Eritromicina	2-20 mg/kg	IM	12-24 h	
	Tilosina	9 mg/kg	IM	12-24 h	
	Tilmicosina	200-400 g/ton	Alimento	-	
	Tulatromicina	2,5 mg/kg	IM	Dosis única	
	Tildipirosina	4 mg/kg	IM	Dosis única	
		Tilvalosina	50-100 g/ton	Alimento	-
		Tilvalosina	50 ppm	Agua	-
	Gamitromicina	6 mg/kg	SC	Dosis única	

* Administración lenta. PO: Oral. IV: Intravenosa. IM: Intramuscular. SC: Subcutánea.

4.1.8.- Mecanismos de resistencia bacteriana a los macrólidos

Las bacterias son capaces de desarrollar varios mecanismos de resistencia que les permiten resistir o eludir la exposición a los antibióticos. Existen tres mecanismos generales relacionados con este fenómeno para la familia de los macrólidos, que corresponden a la disminución de la afinidad por el sitio de unión en la subunidad ribosómica 50S, inactivación del antibiótico por enzimas intracelulares, así como el eflujo o expulsión activa del antibiótico que extrae a los macrólidos del interior de las bacterias³⁴. Cabe destacar que existen bacterias Gram-negativas que no poseen ninguno de estos mecanismos de resistencia, pero pueden presentar mutaciones en genes de expresión de rRNA o proteínas ribosomales que les confiere resistencia innata hacia los macrólidos^{24,85}.

La disminución de la afinidad de los macrólidos por su sitio de unión está asociada a la metilación del RNA ribosomal 23S, debido a la expresión de metiltransferasas del rRNA que se encuentran codificadas en genes denominados *erm* (erythromycin ribosome methylase). El grupo metil transferido obstaculiza la interacción del macrólido con su sitio de unión en el rRNA⁸⁶. Esta condición les ofrece a las bacterias la particularidad de presentar resistencias cruzadas entre los macrólidos de 14, 15 y 16 carbonos, así como para lincosamidas y estreptomicina B⁸⁷. Por otra parte, el incremento del flujo de salida de los macrólidos desde las células bacterianas, se encuentra normalmente asociado a la expresión de bombas de expulsión o alteración en la permeabilidad de la membrana bacteriana^{85,88}, permitiendo en última instancia el funcionamiento fisiológico de los ribosomas bacterianos²⁴. Existen alrededor de 14 genes que codifican la expresión de transportadores dependientes de ATP, los cuales confieren a las bacterias resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, pero no para los macrólidos de 16 carbonos, ketolidos, lincosamidas y estreptomicina B^{24,87}. La inactivación enzimática de los macrólidos es el mecanismo de menor importancia en cuanto a su presentación en las poblaciones bacterianas, en donde se asocia con la expresión intracelular de esterazas y fosfolipasas, las cuales provocan la hidrólisis del macrólido y como consecuencia su inactivación^{87,89}.

Aunque la mayoría de los macrólidos reúnen modificaciones estructurales que les permite mejorar sus características farmacológicas, estos cambios no han prevenido el desarrollo de resistencias por parte de varios tipos de bacterias a los macrólidos, con excepción de los ketolidos que ofrecen una menor posibilidad de generar resistencia a los antibióticos ³⁶.

4.2.- Propiedades farmacocinéticas generales de los macrólidos.

Los cuatro procesos que describen el movimiento temporal de los fármacos a través del cuerpo son absorción, distribución, metabolismo y excreción. Estos procesos pueden ser expresados en términos cuantitativos mediante parámetros farmacocinéticos que explicarán la disposición temporal de los fármacos en el organismo ⁹⁰. Las curvas concentración-tiempo son la base para su cálculo, para lo cual es imprescindible desarrollar y validar técnicas analíticas capaces de cuantificar los fármacos de manera precisa y exacta en distintas matrices biológicas, siguiendo las directrices de las agencias de regulación y control de medicamentos ⁹¹. Los datos así obtenidos permiten el correcto cálculo de los parámetros farmacocinéticos con el objetivo de analizar e interpretar adecuadamente la disposición de los fármacos en el organismo y estimar su utilidad terapéutica en la especie animal de destino.

Los macrólidos se caracterizan por una rápida absorción desde el sitio de su aplicación, siendo usualmente las rutas intramuscular o subcutánea las comúnmente empleadas en animales de granja, en cambio para caballos y pequeñas especies es más frecuente la utilización de la vía oral. Además, los macrólidos presentan usualmente una biodisponibilidad completa con una extensa distribución hacia tejidos y fluidos del sistema respiratorio ⁹². Los macrólidos de primera generación presentan procesos importantes de metabolismo hepático, a diferencia de los macrólidos de nueva generación que en su mayoría son eliminados por vía biliar de forma inalterada, aunque una parte puede ser biotransformado a nivel hepático por procesos de conjugación, siendo entonces excretados por vía biliar para posteriormente ser eliminados junto con las heces ¹⁹. Una característica común de los macrólidos de segunda y tercera generación son sus prolongadas vidas medias de eliminación a consecuencia de su extensa distribución en el organismo ⁹³⁻⁹⁵. Este comportamiento les permite permanecer en el cuerpo por largos periodos de tiempo, situación que provoca la presencia de residuos en tejidos y fluidos orgánicos, que

implicarán la obligatoriedad de la aplicación de tiempos de supresión prolongados, que pueden ser de varias semanas para la mayoría de los macrólidos en las especies de abasto ^{96,97}.

4.2.1.- Absorción y biodisponibilidad

La velocidad de absorción de los macrólidos es dependiente de la ruta de administración seleccionada, así como del macrólido utilizado y la especie animal en estudio. En este sentido la velocidad de absorción de eritromicina, claritromicina, azitromicina y telitromicina les permite alcanzar sus concentraciones máximas dentro de las dos a tres primeras horas tras su administración oral en caballos y perros ^{37,98-102}. Sin embargo, la absorción oral de macrólidos en rumiantes es errática, razón por la cual suelen utilizarse por vía parenteral. En rumiantes el pH ruminal (5,5 – 6,5) repercute en el grado de ionización de los macrólidos, generando un fenómeno conocido como atrapamiento iónico dentro de este compartimento ¹⁰³. Además, en poligástricos la ruta oral ofrece otro inconveniente adicional, el gran volumen de contenido líquido que posee el rumen provoca una importante dilución de la dosis administrada con lo que se reduce la velocidad de difusión del fármaco a consecuencia de la disminución de su gradiente de concentración ^{103,104}.

En términos generales los macrólidos administrados por vía oral se caracterizan por presentar una biodisponibilidad baja a intermedia (< 50%) ^{99,101}. Con respecto a eritromicina, se establece una biodisponibilidad oral baja con perfiles farmacocinéticos erráticos, que se debe principalmente a la degradación estomacal por ser inestable a pH ácido ³⁴. Razón por la cual, se han diseñado recubrimientos entéricos o sales de estolato, fosfato, etilsuccinato, estearato, que resisten la degradación estomacal mejorando su perfil farmacocinético ¹⁰². En el caso de claritromicina y azitromicina, ofrecen una mayor estabilidad estomacal con una biodisponibilidad intermedia (~50%) pero con altos coeficientes de variación ^{100,101}. Además, la velocidad y magnitud de la absorción puede verse disminuida cuando son administrados con el alimento, especialmente en el caso de azitromicina ³³.

Habitualmente en rumiantes se recurre a la administración de macrólidos por vía parenteral para el tratamiento o prevención de varios tipos de enfermedades infecciosas en especial del sistema respiratorio ^{29,79}. Uno de los principales antibióticos autorizado en bovinos, cerdos y ovejas para estos fines corresponde a la tulatromicina¹⁰⁵, la cual presenta una rápida absorción, permitiéndole alcanzar su C_{max} dentro de los primeros 30-90 minutos posterior a su administración

subcutánea en vacas, ovejas y cabras ^{97,106-108}. Esta rápida absorción ocurre también con tilmicosina en vacas, en donde su t_{max} se alcanza una hora después de su administración subcutánea ^{109,110}. Sin embargo, en ovejas y cabras la administración de tilmicosina por vía subcutánea presenta una absorción más lenta, alcanzando su C_{max} entre las cuatro y seis horas posteriores a su administración ^{110,111}.

Los macrólidos que comúnmente se usan en caballos son gamitromicina y tulatromicina, que en esta especie alcanzan su C_{max} una hora después de su administración intramuscular ^{93,95,112}. En cambio, cuando la tulatromicina es administrada por vía subcutánea se absorbe más lentamente, alcanzando su C_{max} a las tres horas ⁹⁵. Por último, en el caso de tilmicosina, las concentraciones máximas se alcanzan más tardíamente, aproximadamente 5 horas tras la administración intramuscular ¹¹³.

La biodisponibilidad de los macrólidos administrados por vía parenteral es muy superior a lo registrado para la ruta oral, con biodisponibilidades por encima del 70%, presentando menor variabilidad, siendo en muchos casos su biodisponibilidad completa ^{95,111,114-116}. Sin embargo, su administración intramuscular y subcutánea puede provocar fenómenos inflamatorios en los puntos de aplicación ¹¹⁷ u otros efectos adversos generalizados, principalmente cuando se hace uso de tulatromicina y tilmicosina ^{95,113}. La interpretación de la biodisponibilidad debe realizarse de forma cuidadosa, en especial cuando la vía de administración es la subcutánea o en aquellos casos en los que se utilicen formulaciones de larga duración o de depósito. En estos casos, la velocidad de eliminación del fármaco puede verse disminuida debido a una menor velocidad de liberación del fármaco desde la formulación medicamentosa, que genere una absorción más prolongada desde el punto de aplicación. En esas situaciones se puede observar el fenómeno farmacocinético denominado *flip-flop* ³⁸, donde la biodisponibilidad puede ser erróneamente reportada con valores por encima del 100% ^{103,117}.

4.2.2.- Distribución tisular y humoral

Los macrólidos se distribuyen ampliamente en el organismo, difundiendo hacia varios órganos, tales como pulmón, hígado o musculatura, entre otros⁹⁷. Una característica clásica de los macrólidos es su tendencia a difundir hacia fluidos orgánicos con pH ácido, tales como la leche¹¹⁸ y el fluido del recubrimiento epitelial del sistema respiratorio^{93,99,100,112,113}. En cambio, su difusión es mínima hacia el líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal, debido a que éstos presentan un pH levemente alcalino^{99,100,113}. Esta característica conlleva que los macrólidos presenten altas concentraciones en los tejidos y fluidos del sistema respiratorio y glándula mamaria en comparación al plasma, fenómeno que responde a su naturaleza liposoluble y bajo grado de ionización a pH alcalino^{33,109}. Esta propiedad se ve reflejada en los elevados volúmenes de distribución registrados para varios macrólidos en veterinaria, con valores que pueden ir desde los 2,5 L/kg, hasta los 40 L/kg, tanto para cabras^{97,107,111,114}, ovejas¹¹⁵ y caballos^{93,95,99,100,112,119}.

Otra característica interesante de los macrólidos es su particular capacidad para acumularse extensamente en el espacio intracelular de polimorfonucleares y macrófagos pulmonares^{93,100,112,113}. Esta particularidad les permite actuar contra agentes infecciosos intracelulares estrictos, tales como *Mycoplasma ovineumoniae* o *Mycoplasma agalactiae* o agentes facultativos como *Rhodococcus equi*, que provocan serias enfermedades en pequeños rumiantes y équidos^{68,120}. Sin embargo, no solo la penetración intracelular y las elevadas concentraciones intracelulares determinan su acción antimicrobiana a este nivel¹²¹, sino también la capacidad del antibiótico de aumentar la susceptibilidad bacteriana a la acción bactericida de los neutrófilos¹²². Respecto a la acción de los macrólidos a nivel intracelular existen discrepancias en cuanto a su acción antibacteriana frente algunos agentes bacterianos intracelulares facultativos, pues se ha demostrado actividad contra *Staphylococcus aureus*¹²³ y *Francisella spp*¹²⁴, pero poca o nula actividad contra *Listeria monocytogenes*¹²⁵ y *Legionella spp*¹²⁶.

La acumulación de los macrólidos a nivel intracelular ocurre cuando estos difunden a un ambiente ácido donde son inmediatamente ionizados dificultando su difusión hacia el espacio extracelular. En este sentido, su acumulación no es uniforme en el espacio intracelular, encontrándose del total del antibiótico un 75% dentro de los lisosomas y únicamente el 25% se encuentra en el citoplasma¹²⁷. Adicionalmente, cuando los macrólidos alcanzan altas

concentraciones intracelulares, éstas condicionan una disminución en la actividad del transportador ABCB1, encargado del flujo de macrólidos hacia el espacio extracelular, intensificando su acumulación a nivel intracelular ¹²⁸. Al respecto, en células bronco-alveolares se registran altas concentraciones intracelulares para azitromicina, claritromicina, timicosina y gamitromicina, correspondiendo a 26-732 veces las obtenidas en el plasma de caballos ^{99,100,112,113}.

4.2.3.- Vida media y conjugación proteica

Una característica común para la mayoría de los macrólidos son sus prolongadas vidas medias, pero especialmente cuando son administrados por vía parenteral, registrándose un amplio rango de valores que van desde las 20 h a 170 h para ovejas ^{106,110,115,129}, cabras ^{97,107,111,114,116} y caballos ^{93,95,100,112,113,117}. La vida media es un parámetro farmacocinético híbrido que es dependiente del aclaramiento plasmático y de la distribución, en especial cuando los fármacos tienen la capacidad de difundir ampliamente en el organismo, condicionando una lenta fase de eliminación ¹³⁰. Con fármacos con este tipo de comportamiento es posible realizar administraciones menos frecuentes, en especial cuando se utilizan macrólidos por vía parenteral. Aunque un menor número de aplicaciones puede ser favorable para el bienestar de los animales, la principal desventaja corresponde a la presencia de sus residuos en leche y carne durante varias semanas, imposibilitando su consumo por el riesgo de generar efectos tóxicos o promover resistencias a los antibióticos ¹³¹. La alta capacidad de difusión de los macrólidos en el organismo no se encuentra limitada por su nivel de unión a las proteínas, debido a que en la mayoría de los casos circulan libremente y solo una baja proporción del fármaco se encuentra unida a proteínas plasmáticas, con valores que oscilan entre 18 y 30%. Además, esta unión es predominante con α -1 glicoproteína más que con la albumina plasmática ^{90,132}.

4.2.4.- Metabolismo

La principal vía de biotransformación para los macrólidos corresponde al metabolismo hepático ^{133,134}, siendo el sistema enzimático *P*-450 el responsable de metabolizar a eritromicina y claritromicina. Los metabolitos resultantes de la biotransformación en muchos casos son altamente activos, como por ejemplo la 14-OH-claritromicina que presenta una actividad antimicrobiana muy superior en comparación al fármaco original ¹³³. En cambio, para el resto de los macrólidos su biotransformación ocurre principalmente por procesos de conjugación, y se establece que en su

mayoría son excretados inalterados (70-90%) a través de la bilis y eliminados junto con el material fecal ¹³⁵.

4.2.5.- Excreción

La excreción de los macrólidos ocurre principalmente por vía biliar (aproximadamente 60-70%) y en menor medida por vía renal ¹⁹. Los macrólidos poseen una naturaleza hidrofóbica que les permite unirse con bastante afinidad a los ácidos biliares. Por lo tanto, cuanto mayor sea su carácter hidrofóbico, presentarán una mayor afinidad por los ácidos biliares y una excreción más rápida del organismo ¹³⁶. La excreción urinaria es marginal para todos los macrólidos, encontrándose concentraciones consideradas subterapéuticas para el tratamiento de infecciones urinarias, a excepción de claritromicina que presenta una elevada eliminación en orina alcanzando concentraciones suficientes para el tratamiento de algunas infecciones a este nivel ³³. En general, los macrólidos presentan un aclaramiento plasmático considerado bajo a moderado en caballos ^{93,95,99,100,117,119}, ovejas ^{110,115,129} y cabras ^{97,107,111,114,116}.

4.2.6.- Interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas se han descrito comúnmente para macrólidos de primera generación con diversos tipos de fármacos, como son relajantes musculares, inhibidores de la bomba de protones, digitálicos, barbitúricos u otros antibióticos ¹³⁷. Al respecto, los macrólidos de 14 carbonos, como eritromicina y claritromicina presentan bastante afinidad por el sistema enzimático citocromo *P*-450, ocasionando interacciones farmacológicas con aquellos fármacos que dependen del mismo sistema para su biotransformación ¹³⁷. Por ello, la coadministración de eritromicina con fármacos como midazolam, teofilina, digoxina, cisaprida, carbamazepina, warfarina, ergotamina, fenitoína, omeprazol y ranitidina puede disminuir/enlentecer su metabolismo hepático, provocando el aumento de sus concentraciones plasmáticas y generando serios riesgos de intoxicación ^{18,138}. En cambio, el sistema enzimático *P*-450 presenta poca afinidad por los macrólidos miembros de 15 y 16 carbonos, por lo que es menos probable encontrar interacciones farmacológicas de este tipo ³³

En relación a la acción antibacteriana que cumplen los macrólidos, existen interacciones tanto antagónicas como sinérgicas con otros antimicrobianos, que deben ser consideradas en el manejo y la prevención de la generación de resistencias bacterianas. Dentro de algunas de este tipo de asociaciones, se ha evidenciado antagonismo cuando es administrado de manera previa eritromicina y a continuación un β -lactámico, lo cual genera una disminución de la efectividad del β -lactámico contra *Streptococcus pneumoniae*¹³⁹. Es bien conocido el efecto sinérgico de la combinación entre macrólidos y rifampicina para el tratamiento de *Rhodococcus equi*^{24,140}. Sin embargo, se ha establecido un efecto antagónico al coadministrar rifampicina con claritromicina o tulatromicina en equinos, se ha evidenciado una disminución en las concentraciones de estos macrólidos en el tejido y fluidos pulmonares^{94,141}, dando lugar a concentraciones por debajo de la MIC₉₀ para *Rhodococcus equi*¹⁴². Este fenómeno antagónico está asociado a la expresión del transportador ABCB1 siendo éste sobre-regulado por rifampicina con la consecuente disminución en la disposición de los macrólidos⁹⁴. Además, esta interacción farmacológica está asociada con una reducción del C_{max} para claritromicina en aproximadamente un 20 a 68%, así como un incremento en la actividad de CYP3A acelerando los procesos de biotransformación de otros fármacos que requieran esa vía¹⁴³. Por último, la combinación de macrólidos con β -lactámicos, fluoroquinolonas o aminoglucósidos puede presentar asociaciones sinérgicas, antagónicas o neutras^{144,145} dependiendo del microorganismo involucrado en el sitio de infección²⁴.

4.2.7.- Toxicidad y efectos adversos

En términos generales los macrólidos son fármacos bastante seguros y bien tolerados por los animales, presentando reacciones adversas en una baja frecuencia en comparación con otros antibióticos. Eritromicina, claritromicina y azitromicina registran las principales reacciones adversas asociadas a trastornos gastrointestinales, tales como cólico, diarrea y vomito, siendo eritromicina la que comúnmente se asocia con estos trastornos¹⁸. Las distintas modificaciones que han sufrido los macrólidos sintéticos han mejorado sus características biológicas y químicas en relación con los anteriores, permitiendo aumentar su actividad antibacteriana, mejorar su disposición y reducir la frecuencia de presentación de efectos adversos^{18,131}. Aunque estos trastornos gastrointestinales son más frecuentes de observar con los macrólidos orales¹⁴⁶, también existen publicaciones de la propensión de tilmicosina, tras su administración parenteral, a generar

diarrea ¹¹³. Se establece que los macrólidos pueden interactuar con receptores de motilina provocando un incremento en la motilidad intestinal, así como en la motilidad gástrica ¹⁸

Se han descrito algunas reacciones adversas generalizadas tras la administración de tulatromicina y tilmicosina, aunque de presentación poco frecuente como son taquipnea, taquicardia, sudoración profusa, debilidad muscular, ataxia, decúbito e inclusive la muerte de los animales en casos muy raros ^{95,113}. Las reacciones locales en los puntos de aplicación intramuscular o subcutánea son sin duda las reacciones que aparecen con mayor frecuencia, tanto para tildipirosina, tulatromicina y tilmicosina ¹¹⁷. Sin embargo, la tulatromicina posee una mayor probabilidad de generar este tipo de reacciones en comparación al resto de macrólidos inyectables. Estas reacciones locales suelen resolverse dentro de las 24-72 horas, aunque en algunas ocasiones pueden estar acompañadas de cojera, decaimiento o decúbito ⁹⁵.

4.3.- Tildipirosina

La tildipirosina es un macrólido semisintético de segunda generación derivado de la tilosina. En la Unión Europea, la tildipirosina está registrada para el tratamiento de enfermedades respiratorias en cerdos y bovinos de carne, con restricción para su uso en bovinos destinados a la producción de leche para consumo humano ¹⁴⁷. Su uso se encuentra orientado al tratamiento del síndrome respiratorio bovino y porcino, siendo administrada primordialmente por vía intramuscular en cerdos o subcutánea en bovinos, con una dosis recomendada de 4 mg/kg para ambas especies ¹⁴⁸. También puede ser usado para el tratamiento metafiláctico del síndrome respiratorio bovino cuando los animales a ser transportados presentan serios riesgos de desarrollar la enfermedad ⁷⁹, aunque su administración debe seguir las normativas establecidas para ese tipo de usos ^{15,84}.

4.3.1.- Estructura

La estructura básica de la tildipirosina está conformada por un macro anillo lactónico de 16 átomos de carbono. La tildipirosina posee un carácter tribásico debido a la adición de tres nitrógenos a su estructura, uno es aportado por una micaminosa y dos por piperidinas. Estos compuestos le confieren a la tildipirosina la capacidad de protonación con un pKa de 9,91, 8,80 y 8,09^{21,149}. En particular, la disposición de cada uno de estos compuestos en el anillo macro lactona corresponde a la micaminosa en el carbono 5, y las dos piperidinas en los carbonos 20 y 23, como se observa en la figura 3.

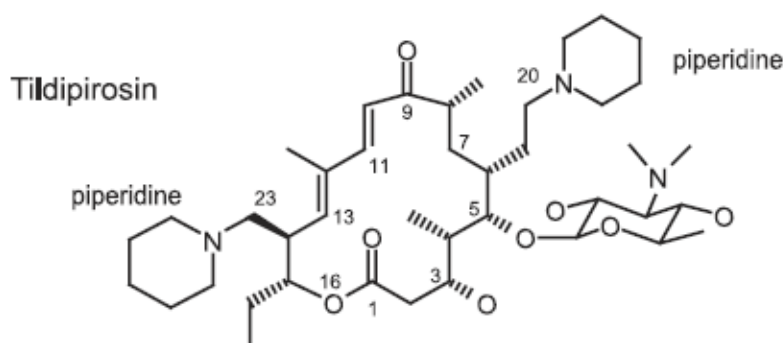


Figura 3. Estructura química de tildipirosina¹⁴⁹.

4.3.2.- Mecanismo de acción y espectro de actividad

El espectro de actividad antibacteriana *in vitro* de tildipirosina es bastante amplio, tanto para bacterias Gram-positivas como para Gram-negativas, demostrando una gran versatilidad antibacteriana frente a los principales agentes patógenos que afectan a las vías aéreas. En este sentido, tildipirosina se encuentra aprobada en la Unión Europea para su uso en cerdos y bovinos con infección de las vías respiratorias producida por *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Histophilus somni* y *Haemophilus parasuis*⁶⁶. Al igual que otros macrólidos, la actividad antimicrobiana de tildipirosina se debe a su unión reversible al RNA ribosomal 23S en la subunidad 50S de los ribosomas de las bacterias inhibiendo su síntesis proteica⁴¹. A diferencia de otros macrólidos, para tildipirosina no existen publicaciones que indiquen un efecto inhibitorio en la formación de exopolisacaridos bacterianos capaces de formar biopelículas como mecanismo de defensa y multiplicación bacteriana. De igual manera, la

tildipirosina no posee efectos inmunomoduladores o antiinflamatorios demostrados a diferencia de otros macrólidos⁶³⁻⁶⁵.

4.3.3.- Farmacocinética de tildipirosina en distintas especies animales

La tildipirosina presenta una rápida absorción, permitiéndoles alcanzar su C_{max} dentro de los primeros 30 a 60 minutos tras su administración tanto intramuscular como subcutánea^{21,116,117,129,150-152}. Además, en la mayoría de las especies domésticas, tales como caballos, perros, conejos y cabras su biodisponibilidad es completa^{116,117,151,152}, en cambio en ovejas es intermedia¹²⁹. Adicionalmente, la tildipirosina registra una amplia distribución en el organismo^{117,151,152} con una difusión predominante hacia tejidos y fluidos a nivel pulmonar^{21,150,153}, alcanzando concentraciones tisulares muy superiores (varias veces) a las registradas en el plasma^{21,150}. De manera similar a lo publicado con otros macrólidos, tildipirosina presenta volúmenes de distribución elevados, registrándose valores en un rango desde los 10 a 29 L/kg en distintas especies domésticas^{21,116,117,129,150-152}. En el tejido pulmonar la tildipirosina se acumula extensamente, alcanzando C_{max} entre 27 a 214 veces superiores a las cuantificadas en el plasma de bovinos¹⁵⁰ y de 8 a 148 veces a las encontradas en el plasma de cerdos²¹. A diferencia de otros macrólidos en donde se ha podido determinar sus concentraciones intracelulares en macrófagos pulmonares o sus concentraciones en el epitelio de recubrimiento pulmonar, la única aproximación existente corresponde a las obtenidas en el lavado bronco alveolar, en donde se ha estimado C_{max} de entre 539 hasta 681 veces superiores a las determinadas en plasma de cerdos²¹. Sin embargo, en bovinos no existe una acumulación tan importante en esta biofase, registrándose niveles hasta 72 veces los registrados en el plasma¹⁵⁰. Paralelamente, no existen estudios que establezcan su acumulación en el espacio intracelular de células somáticas de animales destinados a producción láctea, ni en polimorfonucleares de caballos.

En general, la tildipirosina presenta una prolongada vida media al igual que otros macrólidos, con valores que van entre las 70 a 140 h en las distintas especies domésticas estudiadas^{21,116,117,129,150-152}. La extensa vida media de este antibiótico se debe en primer lugar a su amplia capacidad de distribuirse en el organismo (pulmón, hígado, riñón, musculatura esquelética)¹⁵⁴, así como a una velocidad de eliminación del organismo de baja a intermedia¹⁵⁵. En este sentido, en conejos y cabras se han estimado velocidades de eliminación bajas^{116,151}, e intermedias en caballos

y perros ^{117,152}. En cerdos y bovinos donde la tildipirosina se encuentra autorizada para su uso terapéutico, se establecen periodos de supresión en carne por un tiempo no inferior a 9 días para cerdos y 45 días para bovinos. Se establece que la tildipirosina presenta una baja unión a las proteínas plasmáticas, con un 17% de unión a proteínas plasmáticas en ratas, y alrededor del 30% en cerdo y bovinos, así como a proteínas del fluido bronquial en terneros ⁶⁶ La unión a proteínas de tildipirosina en otras especies animales no se ha descrito, pero ser similar a los valores anteriormente descritos.

La biotransformación de tildipirosina en cerdos y bovinos ocurre principalmente por la escisión de la micaminosa del anillo lactona, en donde el proceso enzimático de dihidroxilación y posterior conjugación con S-cisteína o S-glutación ocurren a nivel hepático. En cambio, a nivel renal la biotransformación de tildipirosina ocurre por un proceso de desmetilación. Por último, en la orina y heces pueden ocurrir procesos de hidrólisis transformando la tildipirosina a compuestos dihidro-tildipirosina-SO₃H ^{66,154}. Al igual que otros macrólidos, la tildipirosina presenta una excreción mayoritariamente inalterada a través del material fecal, en donde un 40 % y un 62% de la dosis administrada es eliminada a través de esta vía en cerdos y bovinos, respectivamente. En cambio, una fracción marginal de la dosis es excretada por vía urinaria, siendo un 17% y 24% de la tildipirosina en cerdos y bovinos, respectivamente ¹⁴⁷. Los parámetros farmacocinéticos de tildipirosina en distintas especies domesticas se presenta en la Tabla 3.

Tabla.3. Parámetros farmacocinéticos de tildipirosina en diversas especies domésticas.

Especie (n)	Dosis y vía	AUC _{0-∞} (ug*hr/mL)	C _{max} (ug/mL)	t _{max} (h)	V _{ss} (L/kg)	V _z (L/kg)	Cl (L/hr/kg)	t _{1/2z} (h)	F (%)	Referencia
Ovejas (8) ⁺	4 mg/kg i.m.	24,8±3,9	0,65±0,14	1,21±0,38	-	-	-	144,1±17,5	71,5	129
	6 mg/kg s.c.	39,6±10,3	0,75±0,22	1,35±0,44	-	-	-	156,5±33,4	75,3	
	4 mg/kg. iv.	34,7 ± 6,3	-	-	-	-	-	119,6±9,0	-	
Perros (24) ⁺⁺	2 mg/kg i.m.	3,85±0,52	0,41± 0,07	0,36 ± 0,2	-	-	-	71,39±28,42	112	152
	4 mg/kg i.m.	7,71±3,58	1,05 ± 0,32	0,08 ±0	-	-	-	91,33 ±50,02	-	
	6 mg/kg i.m.	8,57 ± 4,98	1,06 ± 0,35	0,13 ± 0,07	-	-	-	96,43±45,0	-	
	2 mg/kg i.v.	3,29 ± 1,36	-	-	28,88 ± 7,2	-	0,72±0,29	32,22±12,02	-	
Conejos (12) ⁺⁺	4 mg/kg. i.m.	4,91±0,74	0,83±0,11	0,33 ±0,17	-	-	-	96,68±15,37	105,4	151
	4 mg/kg. iv.	4,64±1,12	-	-	17,78±5,15	-	0,28±0,10	81,17±9,28	-	
Cerdos (24) ⁺⁺	2 mg/kg i.m.	7,09±0,86	0,70±0,48	0,21±0,17	-	-	-	126±19	-	21
	4 mg/kg i.m.	12,10±2,82	0,89±0,45	0,38±0,14	-	-	-	106±15	-	
	6 mg/kg i.m.	14,55±0,94	0,88±0,18	0,26±0,13	-	-	-	97±5	-	
Cabras (15) ⁺	2 mg/kg. s.c.	11,36±1,67	0,57±0,03	0,5±0,00	-	-	-	75,34±2,71	-	116
	4 mg/kg s.c.	20,41±4,38	0,72±0,05	0,5±0,00	-	-	-	94,76±8,13	96,6	
	4 mg/kg i.v.	20,71±3,39	-	-	-	24,6±3,3	0,21±0,02	77,89±4,29	-	
Caballo (12) ⁺⁺⁺	4 mg/kg s.c.	31,01±0,0	0,63-1,95*	0,5-1,5*	-	-	-	170±1,2	>400	117
	4 mg/kg i.v.	7,73±0,00	-	-	10,0±0,9	22±0,6	0,52±0,4	29±0,4	-	
Bovinos (18) ⁺⁺	2 mg/kg s.c.	17,29±2,74	0,37±0,14	0,60±0,22	-	-	-	199±27	-	150
	4 mg/kg s.c.	24,93±3,50	0,71±0,27	0,69±0,26	-	-	-	210±53	-	
	6 mg/kg s.c.	33,20±6,47	1,08±0,29	0,80±0,24	-	-	-	157±17	-	

*Media y error estándar. **Media y desviación estándar. Media geométrica y desviación estándar *Rango. IV: intravenosos. IM: Intramuscular. SC: Subcutáneo.

4.3.4.- Reacciones adversas y toxicidad

La tildipirosina en general presenta mínimas reacciones adversas cuando se siguen las recomendaciones posológicas. En general, la tildipirosina es bastante bien tolerada en la mayoría de las especies animales, inclusive cuando se ha sobrepasado en varias veces la dosis recomendada en bovinos y cerdos, donde se han observado únicamente reacciones locales en el punto de aplicación, incremento en la actividad de enzimas musculares e incremento del recuento total de leucocitos ⁶⁶. Respecto a lo anterior, no existen efectos adversos visibles posteriores a su administración IV (2 mg/kg) o IM (2-6 mg/kg) en perros ¹⁵². No obstante, con dosis de tildipirosina entre los 10 a 20 mg/kg por vía IM en perros puede generar inflamación local en el punto de administración ⁶⁶. Paralelamente, este tipo de reacciones inflamatorias locales han sido registrada de manera casi inmediata (30 min posterior su administración) cuando la tildipirosina ha sido administrada por vía SC (4 mg/kg) en caballos. No obstante, este proceso se resuelve espontáneamente a los pocos días ¹¹⁷.

En pequeños rumiantes la administración de tildipirosina por vía SC (2-4 mg/kg) o IV (4 mg/kg) no está asociado con irritación local, inflamación, edema o con disminución del consumo voluntario de alimento o agua de parte de los animales ^{116,129}. No obstante, la administración de tildipirosina por vía IV (8 mg/kg) en ovejas está asociada con un incremento en la actividad creatina cinasa cardiaca y las concentraciones de troponina I, ambos analitos asociados con cardiotoxicidad ¹⁵⁶.

4.4.- Bibliografía

1. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;Sept:417-433. doi:10.1128/membr.00016-10
2. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance. Published 2018. Accessed May 19, 2023. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/a-oie-list-antimicrobials-may2018.pdf>
3. Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. 1983;36:616-617.
4. Godijk NG, Bootsma MCJ, Bonten MJM. Transmission routes of antibiotic resistant bacteria: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2022;22:482. doi:10.1186/s12879-022-07360-z
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
6. International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank. Drug-Resistant Infections. A Threat to Our Economic Future. Published 2017. Accessed May 18, 2023. <https://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf>
7. World Organisation for Animal Health (OIE). Combating Antimicrobial Resistance and Promoting the Prudent Use of Antimicrobial Agents in Animals. Published 2015. Accessed May 19, 2023. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/a-reso-amr-2015.pdf>
8. de Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*. 2016;13(11):e1002184. doi:10.1371/journal.pmed.1002184
9. World Health Organization. The top 10 causes of death. Published December 9, 2020. Accessed May 19, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
10. Cecchini M, Langer J, Slawomirski L. Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: Economic Issues, Policies and Options for Action. Published 2015. Accessed May 25, 2023. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-Beyond.pdf>
11. Ministerio de Sanidad SS e IgualdadG de E. Informe JIACRA España. Primer analisis del consumo de antibioticos y su relacion con la aparicion de resistencias. Published April 2018. Accessed May 18, 2023. https://www.resistenciaantibioticos.es/sites/default/files/2022-04/informe_jiacra-espana.pdf
12. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE Annual Reporte on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals. Better understanding of the global situation. Fifth Report. Published 2021. Accessed May 19, 2023. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/05/a-fifth-annual-report-amr.pdf>
13. European Commission. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. Published December 22, 2005. Accessed May 25, 2023. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687

14. Wallinga D, Smit LAM, Davis MF, Casey JA, Nachman KE. A Review of the Effectiveness of Current US Policies on Antimicrobial Use in Meat and Poultry Production. *Curr Environ Health Rep.* 2022;9(2):339-354. doi:10.1007/s40572-022-00351-x
15. European Parliament and the Council of the European Union. *Regulation (EU) 2019/4 of the European and of the Council of 11 December 2018 on the Manufacture, Placing on the Market and Use of medicated Feed, Amending Regulation (EC) No 183/2005 of the European Parliament and of the Council and repealing Council Directive 90/167/EEC*; 2019. Accessed May 25, 2023. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/eur182877.pdf>
16. World Health Organization (WHO) F and AO of the UN (FAO) and WO for AH (OIE). Antimicrobial resistance and the United Nations sustainable development cooperation framework. Published 2021. Accessed May 19, 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240036024>
17. Berkner S, Konradi S, Schönfeld J. Antibiotic resistance and the environment—there and back again. *EMBO Rep.* 2014;15(7):740-744. doi:10.15252/embr.201438978
18. Jain R, Danziger LH. The Macrolide Antibiotics: A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Overview. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3045-3053. doi:10.2174/1381612043383322
19. Lenz KD, Klosterman KE, Mukundan H, Kubicek-Sutherland JZ. Macrolides: From Toxins to Therapeutics. *Toxins (Basel).* 2021;13(347). doi.org/10.3390/toxins13050347
20. Kobayashi H. Airway Biofilms Implications for Pathogenesis and Therapy of Respiratory Tract Infections. *Respir Med.* 2005;4(4):241-253. doi:10.2165/00151829-200504040-00003
21. Rose M, Menge M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on in vitro activity against reference strains and field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Pharmacol Ther.* 2013;36(2):140-153. doi:10.1111/j.1365-2885.2012.01397.x
22. Trott DJ, Turnidge J, Kovac JH, Simjee S, Wilson D, Watts J. Comparative macrolide use in humans and animals: Should macrolides be moved off the World Health Organisation’s critically important antimicrobial list? *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(8):1955-1961. doi:10.1093/jac/dkab120
23. European Medicines Agency. Categorisation of antibiotics in the European Union. Published 2019. Accessed May 25, 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
24. Giguère S. Macrolides, Azalides, and Ketolides. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Published online 2013:211-231. doi:<https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch13>
25. Nickell JS, White BJ. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice.* 2010;26(2):285-301. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.006
26. Viola C, DeVincent SJ. Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. *Prev Vet Med.* 2006;73(2-3):111-131. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.09.020

27. Schunicht O, Booker C, Timothyguichon P, Keejim G, Wildman B, Pittman T. An evaluation of the relative efficacy of tulathromycin for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in Nebraska. *Can Vet JI*. 2007;48(6):600-606.
28. Wellman NG, O'Connor AM. Meta-analysis of treatment of cattle with bovine respiratory disease with tulathromycin. *J Vet Pharmacol Ther*. 2007;30(3):234-241. doi:10.1111/j.1365-2885.2007.00846.x
29. Skogerboe TL, Rooney K. Comparative efficacy of tulathromycin, tilmicosin, and florfenicol in the treatment of bovine respiratory disease in stocker cattle. *Vet Ther*. 2005;6(2):167-179. <https://www.researchgate.net/publication/7664968>
30. Rooney KA, Nutsch RG, Skogerboe TL, Weigel DJ, Gajewski K, Kilgore WR. Efficacy of tulathromycin compared with tilmicosin and florfenicol for the control of respiratory disease in cattle at high risk of developing bovine respiratory disease. *Vet Ther*. 2005;6(2):154-166.
31. Szasz JI, McMurphy CP, Bryant TC, et al. Influence of therapeutic use of feedgrade tetracyclines in combination with tulathromycin metaphylaxis on animal health and performance of Holstein steer calves. *Transl Anim Sci*. 2019;3(1):185-194. doi:10.1093/tas/txy135
32. Mazzei T, Mini E, Noveffi A, Periti P. Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother*. 1993;3(Suppl. C, 1):1-9. doi:10.1093/jac/31.suppl_c.1
33. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, et al. Review of Macrolides and Ketolides Focus on Respiratory Tract Infections. *Drugs*. 2001;61(4):443-498. doi:10.2165/00003495-200161040-00003
34. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol*. 2017;174(18):2967-2983. doi:10.1111/bph.13936
35. Kirst HA. New macrolides: expanded horizons for an old class of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1991;28:787-790. doi:10.1093/jac/28.6.787
36. Metersky ML, Huang Y. Ketolide antibiotics: will they ever be used for community-acquired pneumonia? *Ann Res Hosp*. 2017;1:1-1. doi:10.21037/arh.2017.04.16
37. Javicas LH, Giguère S, Womble AY. Disposition of oral telithromycin in foals and in vitro activity of the drug against macrolide-susceptible and macrolide-resistant *Rhodococcus equi* isolates. *J Vet Pharmacol Ther*. 2010;33(4):383-388. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01151.x
38. Davis JL. Pharmacologic Principles. In: Reed S, Bayly W, Sello D, eds. *Equine Internal Medicine*. Fourth. Elsevier; 2018:79-137.
39. Brisson-Noel A, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemother*. 1988;22:13-23. doi:10.1093/jac/22.supplement_b.13
40. Kannan K, Kanabar P, Schryer D, et al. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):15958-15963. doi:10.1073/pnas.1417334111
41. Andersen NM, Poehlsgaard J, Warrass R, Douthwaite S. Inhibition of protein synthesis on the ribosome by tildipirosin compared with other veterinary macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):6033-6036. doi:10.1128/AAC.01250-12

42. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 2003;330(5):1005-1014. doi:10.1016/S0022-2836(03)00662-4
43. Roychoudhury S, May TB, Gill JF, Singh SK, Feingold DS, Chakrabarty AM. Purification and Characterization of Guanosine Diphospho-D-mannose Dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1989;264(16):9380-9385. doi:10.1016/s0021-9258(18)60542-3
44. Parra-Ruiz J, Vidailiac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4329-4334. doi:10.1128/AAC.00455-10
45. Peck KR, Kim SW, Jung SI, et al. Antimicrobials as potential adjunctive agents in the treatment of biofilm infection with *Staphylococcus epidermidis*. *Chemotherapy.* 2003;49(4):189-193. doi:10.1159/000071143
46. Sano M, Hirose T, Nishimura M, et al. Inhibitory action of clarithromycin on glycocalyx produced by MRSA. *J Infect Chemother.* 1999;5:10-15. doi:10.1007/s101560050002
47. Yamasaki O, Akiyama H, Toi Y, Arata J. A combination of roxithromycin and imipenem as an antimicrobial strategy against biofilms formed by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(4):573-577. doi:10.1093/jac/48.4.573
48. Moshynets O V., Baranovskyi TP, Cameron S, et al. Azithromycin possesses biofilm-inhibitory activity and potentiates non-bactericidal colistin methanesulfonate (CMS) and polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2022;17(7 July). doi:10.1371/journal.pone.0270983
49. Nagino K, Kobayashi H. Influence of macrolides on mucoid alginate biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection.* 1997;3(4):432-439. doi:10.1111/j.1469-0691.1997.tb00279.x
50. Athamna A, Athamna M, Medlej B, Bast DJ, Rubinstein E. In vitro post-antibiotic effect of fluoroquinolones, macrolides, β -lactams, tetracyclines, vancomycin, clindamycin, linezolid, chloramphenicol, quinupristin/dalfopristin and rifampicin on *Bacillus anthracis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(4):609-615. doi:10.1093/jac/dkh130
51. Cozens RM, Tuomanen E, Tosch W, Zak O, Suter J, Tomasz A. Evaluation of the Bactericidal Activity of 1-Lactam Antibiotics on Slowly Growing Bacteria Cultured in the Chemostat. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(5):797-802. doi:10.1128/AAC.29.5.797
52. Den Hollander JG, Fuursted K, Verbrugh HA, Mouton JW. Duration and Clinical Relevance of Postantibiotic Effect in Relation to the Dosing Interval. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(4):749-754. doi:10.1128/AAC.42.4.749
53. Munckhof WJ, Borlace G, Turnidge JD. Postantibiotic Suppression of Growth of Erythromycin A-Susceptible and-Resistant Gram-Positive Bacteria by the Ketolides Telithromycin (HMR 3647) and HMR 3004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1749-1753. doi:10.1128/AAC.44.6.1749-1753.2000

54. Wang L, Zhang Y. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. *Braz J Microbiol*. 2009;40:980-987. doi:10.1590/S1517-838220090004000033
55. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC. Telithromycin post-antibiotic and post-antibiotic sub-MIC effects for 10 Gram-positive cocci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52:809-812. doi:10.1093/jac/dkg437
56. Ramadan MA, Tawfik AF, Shibl AM, Gemmell CG. *Post-Antibiotic Effect of Azithromycin and Erythromycin on Streptococcal Susceptibility to Phagocytosis*. Vol 42.; 1995. doi:10.1099/00222615-42-5-362
57. European Medicines Agency. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. Committee for Veterinary medicinal products. Published 2011. Accessed May 25, 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-macrolides-lincosamides-streptogramins-mls-food-producing-animals-european_en-0.pdf
58. Pollock J, Chalmers JD. The immunomodulatory effects of macrolide antibiotics in respiratory disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 2021;71. doi:10.1016/j.pupt.2021.102095
59. Krickler JA, Page CP, Gardarsson FR, Baldursson O, Gudjonsson T, Parnham MJ. Nonantimicrobial actions of macrolides: Overview and perspectives for future development. *Pharmacol Rev*. 2021;73(4):233-262. doi:10.1124/PHARMREV.121.000300
60. Friedlander AL, Albert RK. Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. *Chest*. 2010;138(5):1202-1212. doi:10.1378/chest.10-0196
61. Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol*. 2001;429:209-229. doi:10.1016/s0014-2999(01)01321-8
62. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):590-615. doi:10.1128/CMR.00078-09
63. Lakritz J, Tyler JW, Marsh AE, Romesburg-Cockrell M, Smith K, Holle J.M. Tilmicosin reduces lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophage prostaglandin E(2) production via a mechanism involving phospholipases. *Vet Ther*. 2002;3(1):7-21.
64. Fischer CD, Beatty JK, Zvaigzne CG, Morck DW, Lucas MJ, Buret AG. Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: Tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF- κ B signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):338-348. doi:10.1128/AAC.01052-10
65. Nerland EM, LeBlanc JM, Fedwick JP, et al. Effects of oral administration of tilmicosin on pulmonary inflammation in piglets experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res*. 2005;66(1):100-107. doi:10.2460/ajvr.2005.66.100
66. European Medicines Agency. European public MRL assessment report (EPMAR) Tildipirosin (bovine, porcine and caprine species). Committee for Veterinary medicinal products. Published 2010. Accessed May 25, 2023. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/tildipirosin>

european-public-mrl-assessment-report-epmar-committee-medicinal-products-veterinary-use_en.pdf

67. Hamel D, Richard-Mazet A, Voisin F, et al. Gamithromycin in swine: Pharmacokinetics and clinical evaluation against swine respiratory disease. *Vet Med Sci*. 2021;7(2):455-464. doi:10.1002/vms3.375
68. Giguère S. Therapy of *Rhodococcus equi* Infections in Foals. In: *AAEP Proceedings*. Vol 56. ; 2010:125-128. Accessed May 18, 2023. <https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-10proceedings-z9100110000125.pdf>
69. Scott PR. Treatment and Control of Respiratory Disease in Sheep. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 2011;27(1):175-186. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.016
70. De Koster J, Tena JK, Stegemann MR. Treatment of bovine respiratory disease with a single administration of tulathromycin and ketoprofen. *Veterinary Record*. 2022;190(4):e834. doi:10.1002/vetr.834
71. Nedbalcova K, Satran P, Jaglic Z, Ondriasova R, Kucerova Z. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. *Vet Med (Praha)*. 2006;51(5):168-179. doi:10.17221/5537-VETMED
72. Hinnerskov M, Therkildsen JM, Cordoba G, Bjerrum L. Macrolide overuse for treatment of respiratory tract infections in general practice. *Dan Med Bul*. 2011;58(11):A4356.
73. Pusterla N, Gebhart C. *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative enteropathy in foals. *Vet Microbiol*. 2013;167(1-2):34-41. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.017
74. Marsteller T, Winkelman N, Gebhart C, et al. Efficacy of intramuscular tylosin for the treatment and control of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Vet Ther*. 2001;2(1):51-60.
75. Mavrogianni VS, Menzies PI, Fragkou IA, Fthenakis GC. Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 2011;27(1):115-120. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.010
76. Naccari V, Giofre F, Naccari F. Tulathromycin in the Treatment of Respiratory Infections in Sheep. *Int J Anim Vet Adv*. 2015;7(2):34-39. doi:10.19026/ijava.7.5238
77. Bartram DJ, Moyaert H, Vanimisetti BH, Ramage CP, Reddick D, Stegemann MR. Comparative efficacy of tulathromycin and tildipirosin for the treatment of experimental *Mycoplasma bovis* infection in calves. *Vet Med Sci*. 2016;2(3):170-178. doi:10.1002/vms3.31
78. Compiani R, Baldi G, Bofanti M, et al. Comparison of tildipirosin and tulathromycin for control of bovine respiratory disease in high-risk beef heifers. *Bov Pract (Stillwater)*. 2014;48(2):114-119. doi:10.1002/vms3.31
79. Celestino ML, Fernandes L, Menta PR, et al. The Effect of Metaphylactic Use of Tildipirosin for the Control of Respiratory Disease in Long-Distance Transported Dairy Calves. *Front Vet Sci*. 2020;7. doi:10.3389/fvets.2020.00632
80. Lin J, Hunkapiller AA, Layton AC, Chang YJ, Robbins KR. Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in Chickens. *Foodborne Pathog Dis*. 2013;10(4):331-337. doi:10.1089/fpd.2012.1348

81. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poult Sci.* 2005;84:634-643. doi:10.1093/ps/84.4.634
82. Nagaraja TG, Chengappa MM. Application of research findings and summary of research needs: Bud Britton Memorial Symposium on Metabolic Disorders of Feedlot Cattle. *J Anim Sci.* 1996;2:287-298. doi:10.2527/1998.761323x
83. European Medicines Agency. Tilmicosin (pigs and sheep) Summary report. Committee for Veterinary medicinal products. Accessed May 19, 2023. www.ema.europa.eu
84. Simjee S, Ippolito G. European regulations on prevention use of antimicrobials from January 2022. *Rev Bras Med Vet.* 2022;44. doi:10.29374/2527-2179.bjvm000822
85. Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10). doi:10.1101/cshperspect.a025395
86. Maravic G. Macrolide Resistance Based on the Erm-mediated rRNA Methylation. *Current Drug Targets-Infectious Disorders.* 2004;4:193-202. doi:10.2174/1568005043340777
87. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;282(2):147-159. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x
88. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):35-48. doi:10.1038/nrmicro3155
89. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Bogo Jensen L, Rood J, Seppala H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(12):2823-2830. doi:10.1128/AAC.43.12.2823
90. Papich MA. Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials. In: Riviere JE, Papich MG, eds. *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. First. Wiley Blackwell; 2018:903-954.
91. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Published 2018. Accessed May 18, 2023. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
92. Dedonder KD, Apley MD, Li M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gamithromycin in pulmonary epithelial lining fluid in naturally occurring bovine respiratory disease in multisource commingled feedlot cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 2016;39(2):157-166. doi:10.1111/jvp.12267
93. Berlin S, Randow T, Scheuch E, Grube M, Venner M, Siegmund W. Pharmacokinetics and pulmonary distribution of gamithromycin after intravenous administration in foals. *J Vet Pharmacol Ther.* 2017;40(4):406-410. doi:10.1111/jvp.12402
94. Berlin S, Spieckermann L, Oswald S, et al. Pharmacokinetics and Pulmonary Distribution of Clarithromycin and Rifampicin after Concomitant and Consecutive Administration in Foals. *Mol Pharm.* 2016;13(3):1089-1099. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00907
95. Leventhal HR, McKenzie HC, Estell K, Council-Troche M, Davis JL. Pharmacokinetics and pulmonary distribution of Draxxin® (tulathromycin) in healthy adult horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2021;44(5):714-723. doi:10.1111/jvp.12968

96. Zhang Y, Jiang H, Jin X, et al. Residue Depletion of Tilmicosin in Chicken Tissues. *J Agric Food Chem.* 2004;52(9):2602-2605. doi:10.1021/jf035515z
97. Romanet J, Smith GW, Leavens TL, et al. Pharmacokinetics and tissue elimination of tulathromycin following subcutaneous administration in meat goats. *AJVR.* 2012;73(10):1634-1640. doi:10.2460/ajvr.73.10.1634
98. Zur G, Soback S, Weiss Y, Perry E, Lavy E, Britzi M. Azithromycin pharmacokinetics in the serum and its distribution to the skin in healthy dogs and dogs with pyoderma. *Veterinary Journal.* 2014;200(1):122-126. doi:10.1016/j.tvjl.2013.12.022
99. Womble AY, Giguère S, Lee EA, Vickroy TW. Pharmacokinetics of clarithromycin and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *Am J Vet Res.* 2006;67:1681-1686. doi:10.2460/ajvr.67.10.1681
100. Jacks S, Giguère S, Gronwall PR, Brown MP, Merritt KA. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. *Am J Vet Res.* 2001;62:1870-1875. doi:10.2460/ajvr.2001.62.1870
101. Jacks S, Giguere S, Gronwall RR, Brown MP, Merritt KA. Disposition of oral clarithromycin in foals. *J vet Pharmacol Therap.* 2002;25:359-369. doi:10.1046/j.1365-2885.2002.00420.x
102. Ewing PJ, Burrows G, Macallistert C, Clarke C. Comparison of oral erythromycin formulations in the horse using pharmacokinetic profiles. *vet Pharmacol Therap.* 1994;17:17-23. doi:10.1111/j.1365-2885.1994.tb00516.x
103. Riviere J. Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. In: *Veterinary Pharmacology & Therapeutics.* First. Wiley Blackwell; 2018:8-40.
104. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment. *J vet Pharmacol Therap.* 2004;27:455-466. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x
105. European Medicines Agency. Annex I Summary of product characteristics. Accessed May 26, 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/draxxin-epar-product-information_en.pdf
106. Washburn K, Fajt VR, Coetzee JF, Rice S, Wulf LW, Washburn S. Pharmacokinetics of tulathromycin in nonpregnant adult ewes. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38(4):414-416. doi:10.1111/jvp.12196
107. Young G, Smith GW, Leavens TL, et al. Pharmacokinetics of tulathromycin following subcutaneous administration in meat goats. *Res Vet Sci.* 2011;90(3):477-479. doi:10.1016/j.rvsc.2010.06.025
108. Nowakowski MA, Inskeep PB, Risk JE, et al. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triamilide antibiotic, in cattle. *Vet Ther.* 2004;5(1):60-74.
109. Avci T, Elmas M. Milk and blood pharmacokinetics of Tylosin and Tilmicosin following parenteral administrations to cows. *The Scientific World Journal.* 2014;869096. doi:10.1155/2014/869096
110. Modric S, Webb AI, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *J vet Pharmacol Therap.* 1998;21:444-452. doi:10.1046/j.1365-2885.1998.00177.x

111. Ramadan A. Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Res Vet Sci.* 1997;62:48-50. doi:10.1016/s0034-5288(97)90179-x
112. Berghaus LJ, Giguère S, Sturgill TL, Bade D, Malinski TJ, Huang R. Plasma pharmacokinetics, pulmonary distribution, and in vitro activity of gamithromycin in foals. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012;35(1):59-66. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01292.x
113. Womble AY, Giguère S, Murthy YVSN, Cox C, Obare E. Pulmonary disposition of tilmicosin in foals and in vitro activity against *Rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens. *J Vet Pharmacol Ther* 29, 561–568. 2006;29:561-568. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00804.x
114. Cárceles CM, Font A, Espuny E, Fernández-Varón E, Serrano JM, Escudero E. Pharmacokinetics of azithromycin after intravenous and intramuscular administration to goats. *J Vet Pharmacol Therap.* 2005;28:51-55. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00626.x
115. Cárceles CM, Font A, Escudero E, Espuny A, Marín P, Fernández-Varón E. Pharmacokinetics of azithromycin after i.v. and i.m. administration to sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005;28(5):475-479. doi:10.1111/j.1365-2885.2005.00680.x
116. Elazab ST, Badawy ME. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin in goats using HPLC. *JJVR.* 2020;68(1):5-12. doi:10.14943/jjvr.68.1.1
117. Abu-Basha EA, Bani Ismail Z, Ababneh MM, Hamzeh E, Gehring R. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin following intravenous and subcutaneous administration in horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2021;44(4):544-551. doi:10.1111/jvp.12958
118. Lin Z, Cuneo M, Rowe JD, et al. Estimation of tulathromycin depletion in plasma and milk after subcutaneous injection in lactating goats using a nonlinear mixed-effects pharmacokinetic modeling approach. *BMC Vet Res.* 2016;12(1). doi:10.1186/s12917-016-0884-4
119. Davis JL, Gardner SY, Jones SL, Schwabenton BA, Papich MG. Pharmacokinetics of azithromycin in foals after i.v. and oral dose and disposition into phagocytes. *J Vet Pharmacol Ther.* 2002;25(2):99-104. doi:10.1046/j.1365-2885.2002.00387.x
120. Jaý M, Tardy F. Contagious Agalactia in Sheep And Goats: Current Perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports.* 2019;Volume 10:229-247. doi:10.2147/vmrr.s201847
121. Mandell GL, Coleman EJ. *Activities of Antimicrobial Agents against Intracellular Pneumococci.* *J Antimicrob Agents Chemother* 2000 Sep;44(9):2561-3. doi: 10.1128/AAC.44.9.2561-2563.2000
122. Mandell GL. Uptake, transport, delivery, and intracellular activity of antimicrobial agents. In: *Pharmacotherapy.* Vol 25.; 2005. doi:10.1592/phco.2005.25.12part2.130S
123. Fietta A, Merlini C, Gialdroni Grassi G. Inhibition of intracellular growth of *Staphylococcus aureus* by exposure of infected human monocytes to clarithromycin and azithromycin. *J Chemother.* 1997;9(1):17-22. doi.org/10.1179/joc.1997.9.1.17
124. Ahmad S, Hunter L, Qin A, Mann BJ, van Hoek ML. Azithromycin effectiveness against intracellular infections of *Francisella*. *BMC Microbiol.* 2010;10(123). doi.org/10.1186/1471-2180-10-123
125. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP., Tulkens PM. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and

- fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2095-2103. doi.org/10.1128/AAC.46.7.2095-2103.2002
126. Baltch AL, Bopp LH, Smith RP, Michelsen PB, Ritz WJ. Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in human monocytes. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):104-109. doi.org/10.1093/jac/dki186
 127. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: Current views and perspectives. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006;9(2):218-230.
 128. Munić V, Kelnerić Ž, Mikac L, Eraković Haber V. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;41(1):86-95. doi:10.1016/j.ejps.2010.05.016
 129. Abu-Basha EA, Bani Ismail Z, Abu Alhajjaa H, Hamzeh E, Idkaidek NM. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin following intravenous and subcutaneous administration in sheep. *J Vet Pharmacol Ther*. 2021;44(1):79-85. doi:10.1111/jvp.12901
 130. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life. *J vet Pharmacol Therap*. 2004;27:427-439. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x
 131. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Review of Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin), Ketolids (Telithromycin) and Glycylcyclines (Tigecycline). *Medical Clinics of North America*. 2011;95(4):761-791. doi:10.1016/j.mcna.2011.03.012
 132. Stepanić V, Žiher D, Gabelica-Marković V, et al. Physicochemical profile of macrolides and their comparison with small molecules. *Eur J Med Chem*. 2012;47(1):462-472. doi:10.1016/j.ejmech.2011.11.016
 133. Davey PG. The pharmacokinetics of clarithromycin and its 14-OH metabolite. *J Hosp Infect*. 1991;19(Supplement A):29-37. doi:10.1016/0195-6701(91)90215-t
 134. Kohno Y. Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice. In: *MACROLIDE ANTIBIOTICS Chemistry, Biology, and Practice*. Second. Academic Press; 2002:327-361.
 135. Montesissa C, Capolongo F, Santi A, Biancotto G, Dacasto M. Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes. *Vet J*. 2004;167:87-94. doi:10.1016/s1090-0233(03)00077-7
 136. Glanzer S, Pulido SA, Tutz S, et al. Structural and functional implications of the interaction between macrolide antibiotics and bile acids. *Chemistry - A European Journal*. 2015;21(11):4350-4358. doi:10.1002/chem.201406413
 137. Anadon A, Reeve-Johnson L. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res Vet Sci*. 1999;66:197-203. doi:10.1053/rvsc.1998.0244
 138. Rodvold KA, Piscitelli SC. New Oral Macrolide and Fluoroquinolone Antibiotics: An Overview of Pharmacokinetics, Interactions, and Safety. *Clin Infect Dis*. 1993;17(S1):S193-S199. doi:10.1093/clinids/17.supplement_1.s192

139. Ortega M, Marco F, Soriano A, Gómez J, Almela M, Mensa J. In vitro antagonism between β -lactam and macrolide in *Streptococcus pneumoniae*: How important is the antibiotic order? *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(2):178-180. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.02.030
140. Burton AJ, Giguère S, Berghaus LJ, Hondalus MK. Activity of clarithromycin or rifampin alone or in combination against experimental *Rhodococcus equi* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3633-3636. doi:10.1128/AAC.04941-14
141. Venner M, Peters J, Höhensteiger N, et al. Concentration of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells is influenced by comedication of rifampicin in foals. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010;381(2):161-169. doi:10.1007/s00210-009-0481-1
142. Peters J, Eggers K, Oswald S, et al. Clarithromycin is absorbed by an intestinal uptake mechanism that is sensitive to major inhibition by rifampicin: Results of a short-term drug interaction study in foals. *Drug Meta Dispos*. 2012;40(3):522-528. doi:10.1124/dmd.111.042267
143. Akiyama N, Inui N, Mori K, et al. Effect of rifampicin and clarithromycin on the CYP3A activity in patients with *Mycobacterium avium* complex. *J Thorac Dis*. 2019;11(9):3814-3821. doi:10.21037/jtd.2019.09.06
144. Bellut H, Porcher R, Varon E, et al. Comparison of prognostic factors between bacteraemic and non-bacteraemic critically ill immunocompetent patients in community-acquired severe pneumococcal pneumonia: a STREPTOGENE sub-study. *Ann Intensive Care*. 2021;11(1). doi:10.1186/s13613-021-00936-z
145. Bolhuis MS, Panday PN, Pranger AD, Kosterink JGW, Alffenaar JWC. Pharmacokinetic drug interactions of antimicrobial drugs: A systematic review on oxazolidinones, rifamycines, macrolides, fluoroquinolones, and beta-lactams. *Pharmaceutics*. 2011;3(4):865-913. doi:10.3390/pharmaceutics3040865
146. Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A. Adverse Effects of Macrolide Antibacterials. *Drug Saf*. 1993;9(5):346-364. doi:10.2165/00002018-199309050-00004
147. European Medicines Agency. CVMP assessment report Zuprevo (EMA/V/C/002009). Committee for Veterinary medicinal products. Published May 12, 2011. www.ema.europa.eu
148. European Medicines Agency. Anexo I Ficha técnica o resumen de las características del producto. Committee for Veterinary medicinal products. Published 2011. Accessed May 19, 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zuprevo-epar-product-information_es.pdf
149. Poehlsgaard J, Andersen NM, Warrass R, Douthwaite S. Visualizing the 16-membered ring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site. *ACS Chem Biol*. 2012;7(8):1351-1355. doi:10.1021/cb300105p
150. Menge M, Rose M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in bovine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetized cattle). *J Vet Pharmacol Ther*. 2012;35(6):550-559. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01349.x
151. Xiong J, Xu Y, He S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin in rabbits following single-dose intravenous and intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther*. 2020;43(5):448-453. doi:10.1111/jvp.12882

152. Wang J, Zhao T, Sun X, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in beagle dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2018;41(1):e49-e52. doi:10.1111/jvp.12453
153. Torres F, Santamaria R, Jimenez M, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in pig tonsils. *J Vet Pharmacol Ther.* 2016;39(2):199-201. doi:10.1111/jvp.12258
154. Food and Drug Administration. Zuprevo. Published 2012. Accessed May 18, 2023. <https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/892>
155. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma clearance. *J Vet Pharmacol Therap.* 2004;27:415-425. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x
156. Dik B, Bahcivan E, Faki HE, Uney K. Tildipirosin may cause cardiotoxicity in sheep. *Biomed Res* 2017; 28 (19): 8234-8239. 2017;28(17):8234-8239.

5. OBJETIVOS DE LA TESIS

5.1.- Objetivo general

Determinar la farmacocinética y farmacodinamia de la tildipirosina en pequeños rumiantes y caballos.

5.2.- Objetivos específicos

Primer objetivo: Desarrollar y validar un método cromatográfico para la cuantificación de tildipirosina en plasma y leche para su aplicación en estudios farmacocinéticos en pequeños rumiantes y caballos.

Segundo objetivo: Determinar la farmacocinética de la tildipirosina en ovejas de aptitud cárnica tras su administración intravenosa, subcutánea e intramuscular.

Tercero objetivo: Estudiar el comportamiento farmacocinético de la tildipirosina en caballos tras su administración intravenosa e intramuscular.

Cuarto objetivo: Determinar la farmacocinética de la tildipirosina tras su administración intravenosa, subcutánea e intramuscular en cabras de aptitud láctea.

Quinto objetivo: Establecer los posibles efectos adversos tras la administración de la tildipirosina por las diferentes vías de administración en cabras, ovejas y caballos.

Sexto objetivo: Determinar la susceptibilidad bacteriana de algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas frente a tildipirosina y otros antibióticos de uso común en veterinaria.

Séptimo objetivo: Establecer la potencia de tildipirosina frente algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas en condiciones de cultivo estándar y modificado.

6. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk.

La validación de un método analítico para investigaciones con fármacos es un procedimiento estándar antes de la realización de ensayos preclínicos, biofarmacéuticos y clínicos. Este procedimiento debe seguir las directrices de las autoridades y agencias de control y regulación de fármacos, garantizando la exactitud y precisión de los resultados obtenidos, además de permitir el correcto cálculo de los parámetros farmacocinéticos. La cuantificación de antibióticos por cromatografía líquida, es un método que comúnmente se emplea en la realización de estudios farmacocinéticos. Al respecto, existen varias técnicas cromatográficas descritas para la cuantificación de tildipirosina en diferentes matrices biológicas. Sin embargo, ninguna de estas técnicas se encuentra validada en leche de cabras, imposibilitando la determinación de la disposición de tildipirosina en animales dedicados a la producción láctea. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos que se desarrollaron en la publicación: “Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk”, fueron los siguientes:

Primer objetivo: Desarrollar y validar un método cromatográfico para la cuantificación de tildipirosina en plasma y leche para su aplicación en estudios farmacocinéticos en pequeños rumiantes y caballos.

Cuarto objetivo: Determinar la farmacocinética de la tildipirosina tras su administración intravenosa, subcutánea e intramuscular en cabras de aptitud láctea.

Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma.

El desarrollo de un método cromatográfico consiste en determinar las condiciones ideales para la extracción de un fármaco de interés desde la matriz biológica seleccionada, garantizar la ausencia de compuestos endógenos que interfieran con los tiempos de retención del fármaco, optimizar las condiciones cromatográficas que permitan una eficiente cuantificación del fármaco en las muestras, y finalmente, desarrollar un proceso lo más eficientemente posible, en cuanto al tiempo de ejecución de la técnica, uso de reactivos con menor impacto ambiental y eficiente uso de recursos. En cuanto a la validación del método cromatográfico, este procedimiento se realiza previamente a la ejecución de estudios farmacocinéticos, con el objetivo de garantizar la obtención de resultados exactos, e identificar y minimizar los errores de precisión del método analítico. La cuantificación de los antibióticos mediante técnicas validadas es una premisa para el correcto cálculo de parámetros farmacocinéticos que describan adecuadamente el comportamiento del antibiótico en el organismo. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos que fueron resueltos en la publicación: “Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma”, fueron los siguientes:

Primer objetivo: Desarrollar y validar un método cromatográfico para la cuantificación de tildipirosina en plasma y leche para su aplicación en estudios farmacocinéticos en pequeños rumiantes y caballos.

Tercero objetivo: Estudiar el comportamiento farmacocinético de la tildipirosina en caballos tras su administración intravenosa e intramuscular.

Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration.

El complejo respiratorio ovino es la principal enfermedad causante de pérdidas económicas en las explotaciones ovinas. Estas pérdidas están asociadas a la disminución de la ganancia de peso, tratamientos de animales enfermos y muerte de animales. Su etiología es compleja, involucrando dos o más agentes infecciosos que interactúan entre sí. Las bacterias asociadas a esta enfermedad son *Mannheimia haemolytica* y *Bibersteinia trehalosis*, las cuales pueden ser aisladas junto con *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. o *Escherichia coli*. Existen varias técnicas de manejo rutinarias estresantes en las explotaciones ovinas que pueden predisponer a cuadros de inmunosupresión en los animales, provocando la colonización bacteriana del sistema respiratorio y desencadenando el complejo respiratorio ovino. La terapia antibiótica debe realizarse oportunamente, de forma agresiva y en base a la valoración clínica, con el objetivo de aumentar las probabilidades de recuperación de los animales, junto con la optimización de los recursos económicos y el tiempo del personal. La terapia antibiótica debe mantenerse al menos 1 ó 2 semanas, razón por la cual, es recomendable el uso de formulaciones de larga acción, que permitan concentraciones estables del antibiótico en el sistema respiratorio, y reducir el estrés debido a las administraciones frecuentes. A pesar de la importancia de esta enfermedad, la mayoría de los antibióticos registrados en ovinos, requieren de múltiples administraciones. Razón por la cual, en muchas ocasiones se hace uso de antibióticos aprobados para su uso en otras especies, realizando una práctica de riesgo, pues puede estar asociada a impredecibles reacciones adversas y generación de resistencias bacterianas. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos que se desarrollaron en la publicación: “Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration” fueron los siguientes:

Segundo objetivo: Determinar la farmacocinética de la tildipirosina en ovejas de aptitud cárnica tras su administración intravenosa, subcutánea e intramuscular.

Quinto objetivo: Establecer los posibles efectos adversos tras la administración de la tildipirosina por las diferentes vías de administración en cabras, ovejas y caballos.

Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage.

La rodococosis equina es una bronconeumonía que ocurre en caballos de hasta 6 meses de edad y, que ocasiona importantes pérdidas en la industria equina debido a las graves lesiones pulmonares crónicas, incapacitando a los animales de por vida para desarrollar actividades deportivas de alto rendimiento. Adicionalmente, existen pérdidas económicas asociadas a su diagnóstico, tratamiento, muerte de animales, así como restricción de la venta de animales desde lugares endémicos. En la actualidad los esfuerzos para prevenir y controlar la bronconeumonía por *Rhodococcus equi*, se encuentran centrados en la aplicación de estrictas medidas de bioseguridad, uso de vacunas, transferencia de plasma hiperinmune, monitorización ecográfica rutinaria de los animales susceptibles, diagnóstico temprano y administración oportuna de antibióticos efectivos en base a perfiles de susceptibilidad bacteriana, medidas que en su conjunto, permitan disminuir su mortalidad, morbilidad y las restricciones impuestas para la venta de caballos desde zonas endémicas. Tradicionalmente, la combinación de macrólidos con rifampicina ha sido por décadas el protocolo antibiótico de elección para el tratamiento de la rodococosis equina. No obstante, se han establecido interacciones farmacológicas entre estos antibióticos, constatando que la administración de macrólidos sin rifampicina ofrece mejores perfiles farmacocinéticos y resultados terapéuticos. Paralelamente, la mayoría de los macrólidos para el tratamiento de rodococosis deben ser administrados por vía oral, varias veces durante el día, lo que dificulta su administración por el personal, predisponiendo a la aparición de resistencias bacterianas cuando se incumple el protocolo de tratamiento. Por tal motivo, en la actualidad se busca el uso de macrólidos inyectables que permitan manejar de manera óptima su administración y garantizar su éxito terapéutico. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos que fueron resueltos en la publicación: “Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage”, fueron los siguientes:

Tercer objetivo: Estudiar el comportamiento farmacocinético de la tildipirosina en caballos tras su administración intravenosa e intramuscular.

Quinto objetivo: Establecer los posibles efectos adversos tras la administración de la tildipirosina por las diferentes vías de administración en cabras, ovejas y caballos.

Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats.

La mastitis es la enfermedad más importante en el sector lechero internacional, debido a las pérdidas económicas que ésta ocasiona a consecuencia de la disminución de la producción láctea, tratamientos de los animales infectados, descarte de la leche y eliminación de los animales persistentemente infectados. En el Mediterráneo, la agalaxia contagiosa es una importante causa de mastitis en cabras, debido a la infección por distintas especies del género *Micoplasmas*, siendo *Mycoplasma agalactiae* la más prevalente en España. Esta enfermedad además de comprometer la glándula mamaria, puede estar asociada a cuadros de artritis, queratoconjuntivitis y neumonía, entre otros. Sin embargo, en la actualidad el cuadro más frecuente corresponde animales persistentemente infectados, los cuales son animales asintomáticos que presentan únicamente una reducción en la producción de leche. Por el momento las medidas preventivas más importantes son: cuarentena de los animales que van a ingresar en el rebaño, eliminación de animales persistentemente infectados y el uso de vacunas. Sin embargo, las vacunas no ofrecen una protección completa, por lo cual el uso de antibióticos es aún una herramienta fundamental en el control de brotes de agalaxia contagiosa, siempre que sean utilizados de manera racional y óptima en base a perfiles de susceptibilidad antibacteriana. Los macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas son los antibióticos de elección para el tratamiento de la agalaxia contagiosa. Sin embargo, existen pocos macrólidos registrados para su uso en caprinos de forma sistémica, y que posean una acción a nivel de la glándula mamaria y en los tejidos afectados por *Mycoplasma spp* en cabras. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos que fueron resueltos en la publicación: “Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats”, fueron los siguientes:

Cuarto objetivo: Determinar la disposición farmacocinética de la tildipirosina tras su administración intravenosa, subcutánea e intramuscular en cabras de aptitud láctea.

Quinto objetivo: Establecer los posibles efectos adversos tras la administración de la tildipirosina por las diferentes vías de administración en cabras, ovejas y caballos.

Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the *in vitro* potency of current macrolides.

La mastitis es considerada una de las principales enfermedades en animales destinados a la producción láctea. En particular, esta enfermedad conlleva importantes pérdidas económicas, debido a una reducción en la producción de leche, eliminación de animales enfermos, tratamientos veterinarios de alto costo, y penalizaciones a los productores por la baja calidad de la leche producida. Aunque la mastitis clínica es la más grave para el animal, la mastitis subclínica es aquella que representa mayores repercusiones para el rebaño y el productor, siendo la principal fuente de contagio hacia animales sanos, así como una fuente constante de bacterias zoonóticas hacia los humanos. Los principales agentes infecciosos asociados a mastitis en cabras son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Streptococcus* spp, *Mannheimia hemolítica*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp, entre otros. No obstante, *Mycoplasma* spp es uno de los agentes infecciosos de mastitis que merece especial atención en cabras, debido a las repercusiones productivas que esta enfermedad representa en las explotaciones lecheras en varios países del Mediterráneo europeo. La prevención de esta enfermedad está enfocada en buenas prácticas de manejo antes, durante y después del ordeño, eliminación de animales persistentemente infectados, uso de vacunas, así como el uso de antibióticos en brotes de la enfermedad para evitar el contagio hacia otros animales dentro del rebaño. La administración oportuna de antibióticos efectivos en base a perfiles de susceptibilidad bacteriana es primordial para aumentar las probabilidades de cura y evitar la aparición de resistencias a los antimicrobianos que pueden suponer riesgos para la salud pública. La tildipirosina es un miembro de los macrólidos que posee características interesantes para el tratamiento de varios de los agentes infecciosos causantes de mastitis en cabras, en donde su perfil farmacocinético establece una alta capacidad para distribuirse extensamente en el organismo y acumularse en varios fluidos con pH ácido, como es la leche, así como poseer una acumulación en el espacio intracelular, en donde varios agentes infecciosos ejercen su acción patógena o evaden al sistema inmune. Sin embargo, la susceptibilidad de tildipirosina frente a la mayoría de las principales bacterias causantes de mastitis en cabras no se encuentra reportada en la literatura. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos abordados en la publicación: “Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin,

gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the *in vitro* potency of current macrolides”, fueron los siguientes:

Sexto objetivo: Determinar la susceptibilidad bacteriana de algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas frente a tildipirosina y otros antibióticos de uso común en Veterinaria.

Séptimo objetivo: Establecer la potencia de tildipirosina frente algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas en condiciones de cultivo estándar y modificado.

Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep with fibrinous pneumonia

Existen varios agentes bacterianos asociados al complejo respiratorio ovino. Sin embargo, *Pasteurella multocida* es uno de los principales patógenos comúnmente aislados desde cuadros de neumonía en ovejas. Tradicionalmente se hace uso de tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas para su tratamiento pese a que muchos de estos antibióticos no se encuentran aprobados en la especie ovina, procedimiento terapéutico que está asociado a la aparición de reacciones adversas indeseables en los animales en algunas ocasiones, así como la generación de resistencias bacterianas contra estos antibióticos. La resistencia a los antibióticos es una problemática internacional que requiere de un enfoque interdisciplinario, en donde la monitorización y detección temprana de resistencias bacterianas junto con el uso óptimo y racional de los nuevos antibióticos disponibles en Veterinaria es primordial para minimizar el riesgo de la aparición de resistencias. Respecto a lo anterior, tildipirosina es un macrólido con interesantes cualidades farmacocinéticas, del cual aún no se dispone de perfiles de sensibilidad bacteriana que permitan indicar su valor terapéutico para el control y prevención de la neumonía en ovejas. En consideración a lo anteriormente expuesto, los objetivos resueltos en la publicación: “Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep with pneumonic lesions”, fueron los siguientes:

Sexto objetivo: Determinar la susceptibilidad bacteriana de algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas frente a tildipirosina y otros antibióticos de uso común en Veterinaria.

Séptimo objetivo: Establecer la potencia de tildipirosina frente algunos patógenos asociados con mastitis en cabras y neumonía en ovejas en condiciones de cultivo estándar y modificado.

7. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS

7.1.- Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk.

Autores: Galecio JS, Hernandis V, Escudero E y Marín P.

Revista: Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.

Año de la publicación: 2022.

Ambito: Veterinary Sciences.

Factor de impacto JCR 2021: 0,516.

Rango y cuartil JCR 2021: 126/145 (Q4).

Abstract: A simple, rapid, low-cost, and sensitive high-performance liquid chromatographic method was developed to determine tildipirosin in milk goat. Milk samples were precipitated with acetonitrile, and after evaporation, tildipirosin was determined by reverse-phase chromatography with an ultraviolet detector set at a wavelength of 289 nm. Tildipirosin was separated on a Zorbax Eclipse XDB-C18 column, 150 x 3.0 mm, 5 µm with gradient chromatographic elution. The retention times for tildipirosin and tylosin tartrate were 4.4 min and 10.5 min, respectively. Calibration curves were ranged from 100 to 2500 µg/L. The lower limit of detection was 75 µg/L, and the lower limit of quantitation was 100 µg/L. The accuracy and precision were always <15% except for LOQ < 20%. Mean recovery was 95.6 %. This procedure can be applied to perform pharmacokinetic studies in lactating animals and be useful to detect residues in dairy products.

URL: <https://doi.org/10.12681/jhvms.28300>

7.2.- Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Verónica Hernandis, Elisa Escudero y Pedro Marín.

Revista: Acta Veterinaria-Beograd.

Año de la publicación: 2022.

Ambito: Veterinary Sciences.

Factor de impacto JRC 2021: 1,00

Rango y cuartil JRC 2021: 101/145 (Q3).

Abstract: A simple, rapid, low-cost, and sensitive high-performance liquid chromatographic method was developed to determine tildipirosin in horse plasma. Plasma samples were extracted with diethyl ether, and after evaporation, tildipirosin was determined by reverse-phase chromatography with an ultraviolet detector set at a wavelength of 289nm. Tildipirosin was separated on a Zorbax Eclipse XDB-C18 column, 150 x 3.0 mm, 5 µm with gradient chromatographic elution. The retention times were 3.0 min and 6.4min for tildipirosin and tylosin tartrate, respectively. The total run time was 9 minutes in this method. Calibration curves ranged from 0.1 to 3 µg/mL. The lower limit of detection for plasma was 0.035 µg/mL, and the lower limit of quantitation was 0.1 µg/mL. Both accuracy and precision were always < 12% except for LLOQ < 20%. Mean recovery was 99.5 %. This procedure can be applied to determine tildipirosin concentrations in plasma and be useful to perform pharmacokinetic studies.

URL: <https://doi.org/10.2478/acve-2022-0008>

7.3.- Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elisa Escudero, José Joaquín Cerón, Guiuseppe Crescenzo y Pedro Marín.

Revista: Animals.

Año de la publicación: 2020.

Ámbito: Agriculture, Dairy & Animal Science.

Factor de impacto JCR 2020: 2,752.

Rango y cuartil JRC 2020: 13/63 (Q1).

Abstract: A single-dose disposition kinetics for tildipirosin was evaluated in clinically healthy ewes ($n = 6$) after intravenous (IV), intramuscular (IM), and subcutaneous (SC) administration of a commercial formulation. Tildipirosin concentrations were determined by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Plasma concentration-time data was calculated by non-compartmental pharmacokinetic methods. The apparent volume of distribution (V_{dz}) of tildipirosin after IV administration was 5.36 ± 0.57 L/kg suggesting a wide distribution in tissues and inside the cells. The elimination half-life ($t_{1/2\lambda z}$) was 17.16 ± 2.25 , 23.90 ± 6.99 and 43.19 ± 5.17 h after IV, IM and SC administration, respectively. Following IM administration, tildipirosin was rapidly absorbed ($t_{max} = 0.62 \pm 0.10$ h) even to a greater extent than after SC administration. Time to reach peak concentration (t_{max}) and peak plasma concentrations (C_{max}) differed significantly, but both parameters showed a more significant variability after SC than after IM administration. Bioavailabilities after extravascular administration were high ($>70\%$). Therefore, given general adverse reactions that were not observed in any ewe and favourable pharmacokinetics, tildipirosin could be effective in treating bacterial infections in sheep.

URL: <https://www.mdpi.com/786386>

7.4.- Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elisa Escudero, Elena Badillo y Pedro Marín.

Revista: Research in Veterinary Science.

Año de la publicación: 2022.

Ambito: Veterinary Sciences.

Factor de impacto JRC 2021: 2,554.

Rango y cuartil JRC 2021: 35/145 (Q1).

Abstract: Tildipirosin is a novel semisynthetic macrolide antibiotic exclusively used in veterinary practice to treat respiratory infections. There are no pharmacokinetic or safety information available regarding the use of tildipirosin after intramuscular administration in horses. Thus, the objective of this work was to determine the disposition kinetics of tildipirosin after intravenous (IV) and intramuscular (IM) administration in horses and its potential muscle damage and cardiotoxicity. Six mature, Spanish-breed horses were used in a crossover study with a washout period of 30 days. Tildipirosin (18%) was administered at single doses by IV (2 mg/kg) and IM (4 mg/kg) routes. Tildipirosin plasma concentrations were determined by HPLC assay with ultraviolet detection. Muscle damage and inflammation were assessed by creatine kinase (CK) and haptoglobin (Hp), respectively. Creatine kinase myocardial band (CK-MB) and troponin (Tn) were used to evaluate cardiotoxicity. Tildipirosin in horses reached peak concentrations ($C_{\max} = 1.13 \mu\text{g/mL}$) at 0.60 h (t_{\max}) after IM administration with an absolute bioavailability of 109.2%. Steady-state volume of distribution and clearance were $3.31 \pm 0.57 \text{ L/kg}$ and $0.22 \pm 0.02 \text{ L/h/kg}$, respectively. Tildipirosin did not cause cardiotoxicity since CK-MB and Tn basal levels were not significantly different from those obtained after several days post-administration. Mild local reactions were observed after IM administration. This local inflammation was associated with mild myolysis (CK 239 – 837 UI/L), which was detectable for 48 hours. In brief, tildipirosin could help to treat respiratory infections in horses because it showed extensive distribution, high bioavailability and did not provoke general adverse reactions.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.06.033>

7.5.- Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Pedro Marín, Verónica Hernandis, María Botia y Elisa Escudero.

Revista: Pharmaceutics.

Año de la publicación: 2022.

Ámbito: Pharmacology & Pharmacy.

Factor de impacto JRC 2021: 6,525.

Rango y cuartil JRC 2021: 39/279 (Q1).

Abstract: Tildipirosin is a macrolide currently authorized for treating respiratory diseases in cattle and swine. The disposition kinetics of tildipirosin in plasma, milk, and somatic cells were investigated in dairy goats. Tildipirosin was administered at a single dose of 2 mg/kg by intravenous (IV) and 4 mg/kg by intramuscular (IM) and subcutaneous (SC) routes. Concentrations of tildipirosin were determined by an HPLC method with UV detection. Pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental analysis. Muscle damage, cardiotoxicity, and inflammation were evaluated. After IV administration, the apparent volume of distribution in the steady state was 7.2 L/kg and clearance 0.64 L/h/kg. Plasma and milk half-lives were 6.2 and 58.3 h, respectively, indicating nine times longer persistence of tildipirosin in milk than in plasma. Moreover, if somatic cells are considered, persistence and exposure measured by the area under concentration–time curve (AUC) significantly exceeded those obtained in plasma. Similarly, longer half-lives in whole milk and somatic cells compared to plasma were observed after IM and SC administration. No adverse effects were observed. In brief, tildipirosin should be reserved for cases where other suitable antibiotics have been unsuccessful, discarding milk production of treated animals for at least 45 days or treating goats at the dry-off period.

URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040860>

7.6.- Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the in vitro potency of current macrolides.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elisa Escudero, Juan Carlos Corrales, Edgar García-Romero, Christian de la Fe, Verónica Hernandis y Pedro Marín.

Revista: World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Año de la publicación: 2022.

Ámbito: Biotechnology & Applied Microbiology.

Factor de impacto JCR 2021: 4,253.

Rango y cuartil JRC 2021: 61/159 (Q2).

Abstract: Mastitis is a significant disease in dairy ruminants, causing economic losses to the livestock industry and severe risks to public health. Antibiotic therapy is one of the most crucial practices to treat mastitis, although the susceptibility of caprine mastitis pathogens to current antibiotics has not been tested under standard or modified incubation conditions. This work evaluated the in vitro activity of tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin against caprine mastitis pathogens incubated following standard conditions of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and deviation method by 25% supplementation with goat serum. *Mycoplasma agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., and coagulase-negative Staphylococci (CNS) were isolated from dairy goats with mastitis in Spain. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the broth microdilution technique. The lowest MIC₉₀ under standard conditions was obtained with danofloxacin for mastitis-causing pathogens. An exception was *M. agalactiae*, where danofloxacin and oxytetracycline obtained low values. However, after adding serum, gamithromycin showed the lowest MIC₅₀ for *S. aureus*, *Streptococcus* spp., and CNS. The lowest MIC₅₀ was obtained with all the antibiotics tested (< 0.125 µg/ml) against *M. agalactiae*. Supplementing with serum resulted in a significant variation in tildipirosin and gamithromycin MIC values for CNS, *S. aureus*, *M. agalactiae*, and *E. coli*. In brief, the MIC for antibiotics used against mastitis should be determined

under conditions closely resembling intramammary infections to obtain representative susceptibility patterns against mastitis pathogens. Caprine mastitis pathogens were broadly susceptible to danofloxacin under standard conditions. The potency of macrolides against caprine mastitis pathogens increases when serum is present in culture media.

URL: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03407-0>

7.7.- Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep with fibrinous pneumonia.

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elena Badillo, Elisa Escudero, Juan Carlos Corrales, María Teresa Yuste, Pedro Marín.

Revista: Acta Veterinaria-Beograd.

Año de la publicación: 2023.

Ambito: Veterinary Sciences.

Factor de impacto JRC 2021: 1,00

Rango y cuartil JRC 2021: 101/145 (Q3).

Abstract: Ovine respiratory complex is a significant cause of death in sheep flocks, where *Pasteurella multocida* is the most frequent microorganisms isolated from animals with pneumonia. There is an urgent need to refine the use of different antimicrobials to avoid the problem of antimicrobial resistance and optimize the control of this disease in ovine livestock. The first step in approaching this problem is gaining insights into the antimicrobial susceptibility of ovine pathogens. This work evaluated the in vitro activity of tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin against *Pasteurella multocida* strains isolated from sheep with pneumonic lesions. The strains were incubated following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standard conditions and also with a modified method by 25% supplementation with sheep serum. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using the broth microdilution technique. The lowest MIC₉₀ under standard conditions and by supplementation with sheep serum was obtained with tildipirosin. Sheep serum significantly reduced tildipirosin, gamithromycin, and danofloxacin MIC values for *Pasteurella multocida* strains. In brief, the potency of macrolides against *Pasteurella multocida* increases when sheep serum is added to the culture media.

URL:

7.8.- Aportaciones del doctorando en las publicaciones

D. Juan Sebastian Galecio Naranjo doctorando del Departamento de Farmacología, adscrito al Doctorado en Integración y Modulación en Señales en Biomedicina de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia – España, expresa que las siguientes aportaciones le corresponden en las siguientes publicaciones:

Primera publicación.

Título: Validation of a LC-UV method for determination of tildipirosin in goat milk.

Revista: *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Association*, 72 (4) 4905–4912.
<https://doi.org/10.12681/jhvms.28300>

Mes y año de publicación: Marzo, 2022.

El doctorando participó en la conceptualización, metodología del proyecto de investigación, validación, investigación junto con los análisis del laboratorio, cálculo e interpretación de los datos, redacción del borrador, escritura y revisión del manuscrito final.

Segunda publicación.

Título: Development and Validation of an Improved HPLC-UV Method for the Determination of Tildipirosin in Horse Plasma.

Revista: *Acta Veterinaria-Beograd*, 72(1), 100-110. [DOI: 10.2478/acve-2022-0008](https://doi.org/10.2478/acve-2022-0008)

Mes y año de publicación: Marzo, 2022.

Como consta en la publicación, el doctorando participó en la conceptualización, metodología del proyecto de investigación, validación, investigación junto con los análisis del laboratorio, cálculo e interpretación de los datos, redacción del borrador, escritura y revisión del manuscrito final.

Tercera publicación.

Título: Pharmacokinetics of Tildipirosin in Ewes after Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Administration.

Revista: *Animals*, 10 (Antibiotic Use in Animals), 1-9. [DOI: 10.3390/ani10081332](https://doi.org/10.3390/ani10081332)

Mes y año de publicación: Agosto, 2020.

Como consta en la publicación, el doctorando participó con la metodología del proyecto de investigación, trabajo con programas estadísticos y software, investigación de campo y análisis de laboratorio, análisis e interpretación de los datos, preparación del borrador, edición del manuscrito y visualización del documento. Por último, el doctorando envió el manuscrito como autor de correspondencia y se responsabilizó del proceso editorial y envió de la versión final para su publicación.

Cuarta publicación

Título: Pharmacokinetics of tildipirosin in horses after intravenous and intramuscular administration and its potential muscle damage.

Revista: *Research in Veterinary Science*, 152, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.06.033>

Mes y año de publicación: Julio 2022.

Como consta en la publicación, el doctorando participó en el diseño del experimento, metodología del proyecto de investigación, trabajo con programas estadísticos y software, investigación de campo y análisis de laboratorio, análisis e interpretación de los datos, preparación del borrador, edición del manuscrito y visualización del documento. Por último, el doctorando envió el manuscrito como autor de correspondencia y se responsabilizó del proceso editorial y envió de la versión final para su publicación.

Quinta publicación.

Título: Pharmacokinetics of Tildipirosin in Plasma, Milk, and Somatic Cells Following Intravenous, Intramuscular, and Subcutaneous Administration in Dairy Goats.

Revista: *Pharmaceutics*, 14 (860). [DOI: 10.3390/pharmaceutics14040860](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040860)

Mes y año de publicación: Abril, 2022.

Como consta en la publicación, el doctorando participó en el diseño del experimento, metodología del proyecto de investigación, trabajo con programas estadísticos y software, investigación de campo y análisis de laboratorio, análisis e interpretación de los datos, preparación del borrador, edición del manuscrito y visualización del documento.

Sexta publicación.

Título: Susceptibility of caprine mastitis pathogens to tildipirosin, gamithromycin, oxytetracycline, and danofloxacin: effect of serum on the in vitro potency of current macrolides.

Revista: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38:221. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03407-0>

Mes y año de publicación: Septiembre, 2022.

Como consta en la publicación, el doctorando participó con la metodología del proyecto de investigación, validación, análisis formal e interpretación de los datos, preparación del borrador, edición del manuscrito y visualización del documento. Por último, el doctorando envió el manuscrito como autor de correspondencia y se responsabilizó del proceso editorial y envió de la versión final para su publicación.

Séptima publicación.

Título: Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep with fibrinous pneumonia.

Revista: *Acta Veterinaria-Beograd*, 73 (2).

Mes y año de publicación: Mayo, 2023.

Como consta en la publicación, el doctorando participó en el diseño del experimento, metodología del proyecto de investigación, trabajo con programas estadísticos y software, investigación de campo y análisis de laboratorio, análisis e interpretación de los datos, preparación del borrador, edición del manuscrito y visualización del documento.

8. COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

8.1.- Determination of Tildipirosin in horse plasma using HPLC.

Tipo: Poster

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elisa Escudero y Pedro Marín.

Congreso: 16th World equine Veterinary Association Congress.

Lugar y fecha: Verona – Italia. 3 al 5 de octubre de 2019.

DETERMINATION OF TILDIPIROSIN IN HORSE PLASMA USING HPLC.



Juan Sebastian Galecio^{1,2,3}, Elisa Escudero², Pedro Marín²
¹ Universidad San Francisco de Quito. Colegio Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Veterinaria. Cumbayá - Ecuador.
² Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, 30100 Campus Espinardo, Murcia, España.
³ Fundación Carolina, C/ Serrano Galvache, número 26, Torre sur, 3ª planta, 28071, Madrid, Spain



PURPOSE OF THE WORK

Tildipirosin is a new antibiotic belonging to the group of macrolids and commercialized for veterinary use in pigs and cows. It has a large distribution volume combined with low plasma protein binding, which allows it to reach tissue concentrations higher than concurrent serum concentrations. Tildipirosin is being used to treat respiratory and intracellular infections. It might be of use to treat *Rhodococcus equi* in foals. Objective. Describe a HPLC technique with UV detection of tildipirosin in horse plasma to study its pharmacokinetics

MATERIAL AND USED METHODS

We used a HPLC Agilent Infinity 1220 with UV detector and a Gilson auto injector. The HPLC separation was realized using a reversed phase column Liquidpurple ODS of 5µm 250x4.6mm at 30°C. Formic acid 0,3 % and acetonitrile was used as a mobile phase with a gradient method during 14 minutes at a constant flow rate of 1ml/min. The detection was performed using a wavelength of 289nm. The calibration line was implemented with quality control (QC) of tildipirosin in a range of 50-5000 µg/L using tilosin as the internal standard (IS). After adding 10µL of IS and 25 µL of QC to 425µl of horse plasma to each sample, all were homogenized with 900uL of acetonitrile in a vortex during 1 min. Afterwards all samples were centrifuged during 10 min at 1600g. The supernatant was dried off in a vacuum centrifuge and the samples resuspended in 75uL of mobile phase. The validation method was elaborated following the EMEA instructions.

OUTCOMES

The peak corresponding to tildipirosin and IS were detected at 5.5 and 8.7 min respectively and without interference of endogens compounds in retention times (Figure 1 & 2). The precision of the intra-day and inter-day were lower than 13.7% and 12% respectively. The quantification limit was 75ug/L and the detection limit 50ug/L. The recuperation percentage of tildipirosin was 80%. The calibration curve showed a linear response with a correlation coefficient (R^2) of 0.9974.

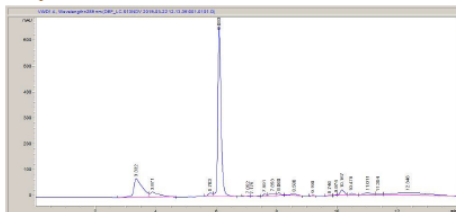


Figure 1. Chromatogram without interference of endogenous compounds in retention times of Tildipirosin and IS.

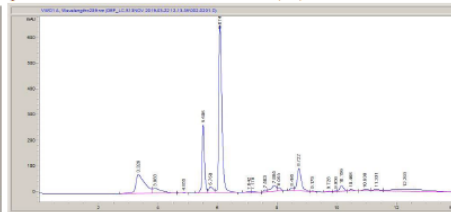


Figure 2. Chromatogram with the retention times of Tildipirosin (5.5minutes) at a concentration of 5.000ug/L and IS (8.7minutes).

CONCLUSIONS

The HPLC method with UV detection is a simple and rapid method which can be used in pharmacokinetic studies.

References.

Zhixin Lei, et al. 2017. The pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and cut-off values of tildipirosin against *Haemophilus parasuis*. *Oncotarget* 9(2) 1-18.

Address for Correspondence

Dr. Juan Sebastian Galecio - Universidad San Francisco de Quito, Av. Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170901 Cumbayá, Ecuador - Phone +34692931855 - Mobile +34692931855 - E-mail jgalecio@usfq.edu.ec

8.2.- Effect of serum on the *in vitro* activity of gamithromycin against *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis in goats.

Tipo: Poster

Autores: Juan Sebastian Galecio, Elisa Escudero y Pedro Marín.

Congreso: Tenth International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM).

Lugar y fecha: Bruselas - Bélgica. 30 de junio al 3 de julio de 2020.

EFFECT OF SERUM ON THE *IN VITRO* ACTIVITY OF GAMITHROMYCIN AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM MASTITIS IN GOATS

Juan Sebastián Galecio^{1,2}, Elisa Escudero¹, Pedro Marín¹
¹ Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30.071-Murcia, Spain.
² Escuela de Medicina Veterinaria, Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá EC 170157, Ecuador.

INTRODUCTION

The prudent use of antimicrobial drugs by applying pharmacokinetics and pharmacodynamics principles is critical to avoid antibiotic resistance and ineffective treatment. Nevertheless, the use of PK/PD principles in macrolides is complicated due to discrepancies between *in-vivo* plasma concentrations and *in-vitro* minimum inhibitory concentrations (MIC). In this regard, modifying *in-vitro* conditions for tulathromycin or tildipirosin like the *in-vivo* conditions such as pH, presence of serum, or enrichment with CO₂, demonstrated a reduction in MIC values for *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, or *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Lee et al 2015; Rose et al 2013). Therefore, the objective of this work was to determine gamithromycin MICs for *Staphylococcus aureus* in 25% of goat serum admixed with Mueller-Hinton Broth (MHB).

MATERIALS AND METHODS

Minimum inhibitory concentrations of gamithromycin for thirty-seven isolates of *S. aureus* obtained from mastitis in goats were evaluated to grow logarithmically in MHB and MHB plus 25% goat serum. The MIC of gamithromycin from each isolate was established by broth microdilution test according to CLSI methods (CLSI, 2008). MIC values were evaluated in ECOFFinder to determine wild-type populations of *S. aureus* (ECOFF 99%). The *S. aureus* (ATCC 29213) strain was used as quality control. Differences in MIC values between MHB and MHB supplemented with serum were compared using the *paired t-test*.

RESULTS

MICs are presented as range and MIC₉₀ in table 1. Supplementation with goat serum by 25% resulted in a decrease in MIC of *S. aureus*. This reduction was mainly influenced by increased sensitivity observed in the wild-type population of *S. aureus*. The wild population without supplementation obtained a MIC range of 0.25 to 2 µg/ml and MIC₉₀ = 1 µg/ml. Instead, the wild population with goat serum supplementation presented a range of 0.03 to 0.25 µg/ml and MIC₉₀ = 0.25 µg/ml (Table 1).

Table 1. Minimum inhibitory concentration of gamithromycin on *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitic goat milk (n = 37) and wild-type population of above *Staphylococcus aureus* strains (n = 29) in MHB and MHB supplementing with goat serum by 25%.

	Range of MIC (MIC ₉₀) in µg/ml	
	MHB	MHB + goat serum (25%)
<i>S. aureus</i> (n=37)	0.25-128 (128)	0.03-128 (128)*
Wild-type population of <i>S. aureus</i> (n=29)	0.25-2 (1)	0.03-0.25 (0.25) *


*Indicate difference (p<0.05) with respect MHB.

CONCLUSION

Goat serum has a positive effect on gamithromycin activity against *Staphylococcus aureus*.

REFERENCES

Lee P et al. (2015). Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of amoxicillin for the calf pathogens *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *J Vet Pharmacol Ther.* 38(5):457-70.
Rose M et al. (2013). Pharmacokinetics of tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on *in vitro* activity against reference strains and field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Pharmacol Ther.* 36(2):140-53.
CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. M31-A3, 3rd ed.



8.3.- Pharmacokinetics of tildipirosin after intravenous administration to horses and evaluation of its potential cardiotoxic effect.

Tipo: Poster

Autores: Pedro Marín, Elisa Escudero y Juan Sebastián Galecio.

Congreso: Tenth International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM).

Lugar y fecha: Bruselas - Bélgica. 30 de junio al 3 de julio de 2020.

PHARMACOKINETICS OF TILDIPIROSIN AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION TO HORSES AND EVALUATION OF ITS POTENTIAL CARDIOTOXIC EFFECT

Pedro Marín¹, Elisa Escudero¹, Juan Sebastián Galecio^{1,2}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30.071-Murcia, Spain.
² Escuela de Medicina Veterinaria, Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá EC 170157, Ecuador

INTRODUCTION


In foals, *Rhodococcus equi* is considered one of the most common agent that causes severe pneumonia, presenting a high morbidity and mortality.¹ Tildipirosin is a 16-membered ring macrolide antimicrobial exclusively used in veterinary practice that has been approved for parenteral treatment of respiratory illness in cattle and swine. However, cardiotoxicity has been described after the administration of tildipirosin in sheep.²

Therefore, the objective of this work was to determine the disposition kinetics of tildipirosin after intravenous (IV) administration to horses and evaluate its potential cardiotoxic effect in these species.

MATERIALS AND METHODS

Six Spanish-breed mature horses were used. Each animal received single IV injections of tildipirosin (Zuprevo 180, MSD Salud Animal, Salamanca, Spain) at 2 mg/kg with at least a 30-day washout period. Blood samples were collected before and at predetermined times over a 120 h-period. Plasma concentrations of tildipirosin were determined by a previously validated high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection.

Potential cardiotoxicity was evaluated by Creatine Kinase cardiac isoenzyme (CK-MB) and Troponin (Tn) determination. Non-compartmental pharmacokinetic parameters were estimated using WinNonlin ProfessionalTM (version 5.2).



Spanish-breed horse from Veterinary Teaching Farm, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia.

RESULTS AND DISCUSSION.

The values of the main pharmacokinetic parameters are presented in the following table 1.

Following IV injection at a dose of 2 mg/kg, tildipirosin did not cause cardiotoxicity because CK-MB and Tn basal levels (day -1) were not significantly different from those obtained after several days postadministration.

Detectable levels of tildipirosin were obtained until 24 hours. Following IV injection of tildipirosin, apparent volumes of distribution ($V_d = 3.78$ L/kg and $V_{d\alpha} = 2.99$ L/kg) were high but lower than those of other macrolides such as gamithromycin ($V_{d\alpha} = 22.8$ L/kg)³ and clarithromycin ($V_d = 9.9$ L/kg)⁴, perhaps due to a different analytical technique used in the present study.

Table 1. Pharmacokinetic parameters (arithmetic mean \pm s.d.) of tildipirosin in horses after intravenous administration at a single dose of mg/kg (n=6).

Parameters	Arithmetic mean \pm SD
k_{el} (h ⁻¹)	0.05 \pm 0.01
$t_{1/2}$ (h)	12.97
V_d (L/kg)	3.78 \pm 0.42
MRT (h)	12.87 \pm 1.94
CL (L/h/kg)	0.23 \pm 0.01
AUC ₀₋₂₄ (mg-h/L)	17.23 \pm 1.54

* Harmonic mean


REFERENCES

¹ Giguère, S. (2017) Treatment of infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet. Clin. Equine Pract.* 33(1), 67-85.

² Dik, B., Balciyan, E., Faki, H.E. and Uney, K. (2017) Tildipirosin may cause cardiotoxicity in sheep. *Biomed. Res.* 28(19), 8224-8226.

³ Beilin, S., Randow, T., Scheuch, E., Grabe, M., Vennis, M. and Siegmund, W. (2017) Pharmacokinetics and pulmonary distribution of gamithromycin after intravenous administration in foals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40, 406-410.

⁴ Wombite, A.Y., Giguère, S., Lee, E.A. and Vickroy, T.W. (2008) Pharmacokinetics of clarithromycin and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *Am. J. Vet. Res.* 67, 1681-1686.



9. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los distintos experimentos desarrollados para esta tesis doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Las dos técnicas analíticas validadas para los experimentos permitieron cuantificar de forma exacta y precisa la tildipirosina presente en muestras de plasma de caballos, ovejas y cabras, y en leche y células somáticas de cabra. Ambas técnicas fueron capaces de describir el comportamiento de las curvas de concentración/tiempo en caballos, cabras y ovejas, permitiendo calcular adecuadamente los parámetros farmacocinéticos de tildipirosina en estas especies animales. No obstante, la técnica desarrollada de extracción líquido-líquido con dietiléter y modificación del pH fue superior a la técnica de precipitación de proteínas con acetónitrilo. Las principales ventajas fueron su mayor eficiencia en cuanto al tiempo de ejecución, menor uso de reactivos para su realización y ausencia de compuestos endógenos que puedan interferir con los tiempos de retención de tildipirosina y/o el estándar interno (tilosina).

La absorción por vía intramuscular en ovejas, cabras y caballos es más rápida y en una mayor magnitud a la registrada por vía subcutánea. Independiente de la vía de administración la disponibilidad de tildipirosina es completa en caballos y cabras, en cambio en ovejas es moderada. En base a los perfiles de absorción y disposición de tildipirosina en ovejas, cabras y caballos se establece que la vía intramuscular permite una exposición antibiótica más estable en comparación a la vía subcutánea, con menor riesgo de subexposición bacteriana y, por tanto, de desarrollo de resistencias bacterianas contra este macrólido.

La tildipirosina presenta vidas medias prolongadas y elevados volúmenes de distribución tras la administración extravascular que evidencian una extensa distribución hacia tejidos y fluidos periféricos en las especies estudiadas. En particular, en cabras en lactación, la tildipirosina se distribuye ampliamente hacia la glándula mamaria encontrándose altas concentraciones del antibiótico en leche y células somáticas con una relación de 22 a 45 veces superior en esas matrices que las concentraciones registradas en plasma. Además, la vida media de eliminación de tildipirosina fue significativamente inferior en cabras lecheras que en ovejas y caballos. Esta diferencia puede estar asociada a la alta excreción de tildipirosina a través de la leche, constituyendo una vía de eliminación accesoria dada las elevadas concentraciones alcanzadas en

este fluido. Se determinó que es necesario un tiempo de supresión de al menos 45 días para no detectar residuos de tildipirosina en leche de cabra.

La administración de tildipirosina en ovejas, cabras y caballos por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea es segura en cuanto a que no registra efectos adversos generalizados. Únicamente se registraron reacciones locales en caballos tras la administración por vía intramuscular. En todas las especies animales estudiadas la aplicación de tildipirosina por vía intramuscular causó una miolisis de carácter leve, que no se acompañó de un proceso inflamatorio evidente. Esta condición se resolvió de forma espontáneamente en el transcurso de las 24 a 48 horas posteriores a la aplicación de tildipirosina. Por tanto, se puede afirmar que la administración de tildipirosina por las diferentes vías de administración estudiadas en ovejas cabras y caballos es segura.

Existe una baja susceptibilidad bacteriana a la tildipirosina por parte de los principales agentes causante de mastitis en cabra en comparación con danofloxacino u oxitetraciclina en condiciones de cultivo estándar (CLSI). En cambio, el principal agente de neumonía fibrinosa en ovejas sí fue altamente sensible a dicho macrólido. Además, la potencia de la tildipirosina se incrementó cuando se añadió suero al medio de cultivo. Por tanto, los estudios de susceptibilidad bacteriana para la tildipirosina deberían realizarse bajo condiciones similares o semejantes a las encontradas en el lugar de la infección.

10. CONCLUSIONS

Based on the results obtained from the various experiments conducted for this doctoral thesis, the following conclusions have been drawn:

The two analytical techniques validated for the experiments allowed for accurate and precise quantification of tildipirosin in plasma of horses, sheep and goats, and milk and somatic cell samples from goats. Both techniques effectively described the concentration-time curves of tildipirosin in horses, goats, and sheep, enabling the calculation of pharmacokinetic parameters in these animal species. However, the liquid-liquid extraction technique using diethyl ether and pH modification proved to be superior to the protein precipitation technique with acetonitrile. This technique offered several advantages, including shorter execution times, reduced reagent usage, and the absence of endogenous compounds that could interfere with the retention times of tildipirosin and the internal standard (tylosin).

In terms of administration, intramuscular absorption in sheep, goats, and horses was faster and more extensive compared to subcutaneous administration. Regardless of the route of administration, tildipirosin exhibited complete availability in horses and goats, while in sheep, it was moderate. Based on the absorption and disposition profiles of tildipirosin in these animal species, it can be concluded that intramuscular administration provides a more consistent antibiotic exposure compared to the subcutaneous route, which reduces the risk of bacterial sub-exposure and, consequently, the development of bacterial resistance to this macrolide.

Tildipirosin exhibits prolonged half-lives and high distribution volumes following extravascular administration, indicating extensive distribution to tissues and peripheral fluids in these species. Specifically, in lactating goats, tildipirosin is widely distributed to the mammary gland, resulting in high antibiotic concentrations in milk and somatic cells, with levels 22 to 45 times higher than those found in plasma. Moreover, the elimination half-life of tildipirosin was significantly shorter in dairy goats compared to sheep and horses. This difference can be attributed to the high excretion ratio of tildipirosin through the milk, which constitutes an additional elimination route due to the elevated drug concentrations in this fluid. It has been determined that a suppression period of at least 45 days is needed to ensure the absence of tildipirosin residues in goat milk.

Intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration of tildipirosin in sheep, goats, and horses has no generalized adverse effects. Only local reactions were observed in horses following intramuscular administration. In all the animal species studied, the intramuscular application of tildipirosin resulted in mild myolysis, which showed no apparent signs of inflammation. This condition spontaneously resolved within 24 to 48 hours after tildipirosin administration. Therefore, administering tildipirosin by the different routes studied in sheep, goats, and horses is safe.

There is a low bacterial susceptibility to tildipirosin among the main causative agents of goat mastitis compared to danofloxacin or oxytetracycline under standard culture conditions (CLSI). However, *Pasteurella multocida* exhibited high sensitivity to this macrolide. Furthermore, the potency of tildipirosin increased when serum was added to the culture medium. Therefore, bacterial susceptibility studies for tildipirosin should be conducted under similar or comparable conditions to those encountered at the site of infection.

11. APENDICES

11.1.- Estancias de investigación

Institución: Universidad Complutense de Madrid

Lugar y Fechas: Madrid - 24 de febrero al 6 de marzo del 2020.

Investigador responsable: Casilda Rodríguez

Objetivos científicos: Introducción al uso del análisis de Montecarlo para el modelamiento Farmacocinético - Farmacodinámico en el programa Oracle.

Institución: Universidad de País Vasco.

Lugar y Fechas: Vitoria - 1 al 16 de julio de 2021.

Investigador responsable: Arantxa Islas

Objetivos científicos: Introducción a la integración Farmacocinética - Farmacodinámica asociados a pacientes críticos en medicina humana.

Institución: Universidad Complutense de Madrid

Lugar y Fechas: Madrid - 19 al 23 de julio 2021.

Investigador responsable: Casilda Rodríguez

Objetivos científicos: Realización de ejercicio de modelación Farmacocinético - Farmacodinámico en el programa Oracle – Monte Carlo.

Institución: Universidad San Francisco de Quito

Lugar y Fechas: Zuleta y Cumbayá. 16 de octubre 2021 al 4 de noviembre del 2022.

Investigador responsable: Antonio Machado.

Objetivos científicos: Reproducibilidad de las técnicas de análisis cromatográficos para la detección de tildipirosina en plasma de alpacas. Reproducibilidad de la técnica para la determinación de la susceptibilidad antibacteriana de *Rhodococcus equi*. Obtención y procesamiento de muestras de plasma de alpacas y análisis de los resultados cromatográficos. Procesamiento de muestras de *Rhodococcus equi*, preparación de medios de cultivo, soluciones

stock, dilución de antibióticos y estandarización de los inóculos bacterianos. Redacción y edición de dos publicaciones para revisión de pares.

Publicaciones derivadas de la estancia de investigación y que se encuentran en revisión de pares:

- Juan Sebastián Galecio, Elisa Escudero, David Egas, Luis Mena, Elena Badillo, Verónica Hernandis, Pedro Marín. “Pharmacokinetics of tildipirosin in alpacas after parenteral administrations”. En revisión desde abril 2023 en la revista *Research in Veterinary Sciences*.
- María Paz Zúñiga, Elena Badillo, Pedro Abalos, Eduardo David Valencia, Elisa Escudero, Pedro Marín and Juan Sebastian Galecio. “Antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi* strains isolated from foals in Chile”. En revision desde enero 2023 en la revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

11.2.- Formación docente e investigativa

Profesor titular en clases de pregrado en la Escuela de Medicina Veterinaria del Colegio de Ciencias de la Universidad San Francisco de Quito, impartiendo un total de 480 horas en los periodos académicos 2021/2022 y 2022/2023 en las asignaturas Fundamentos a la Farmacología, Farmacología Veterinaria y Toxicología, Enfermedades parasitarias, Diagnóstico clínico y Técnica operatoria y cirugía.

Formulación y presentación del proyecto de investigación. Estudio farmacocinético de tildipirosina en alpacas (*Vicugna pacos*). Proyecto ID: 17213. Universidad San Francisco de Quito.

Formulación y presentación del proyecto de investigación. Susceptibilidad antimicrobiana para agentes causantes de neumonía en camelidos sudamericanos y potros. Proyecto ID: 17509. Universidad San Francisco de Quito.

Colaboración en la maestría de la Dra. María Paz Zúñiga en la Universidad de Rio Cuarto Argentina.

Pertenencia al Grupo de Investigación E095-06 “Resistencia Antimicrobiana en Sanidad Animal”.

Pertenencia como miembro activo del Comité de Ética en la investigación y docencia en animales de la Universidad San Francisco de Quito.

11.3.- Becas y reconocimientos

Obtención de beca para estancias en España y en el extranjero de estudiantes de doctorado en líneas de actuación de la Escuela Internacional de Doctorado (R-21/2020). Monto: 3000 euros (por pandemia renuncia).

Obtención de Beca de movilidad Internacional con Iberoamérica para jóvenes investigadores y estudiantes de doctorado de la UMU al amparo del programa becas Iberoamérica. Santander Investigación 2020-2021 convocadas por resolución del rector R-222/2020 de 21 de febrero de 2020. Monto: 5000 euros (Por pandemia renuncia).

Obtención del primer año de beca de la Fundación Carolina en convenio con la Universidad San Francisco de Quito para realizar el programa de doctorado en Integración y modulación en señales en biomedicina - Farmacología.

Obtención del segundo año de beca de la Fundación Carolina en convenio con la Universidad San Francisco de Quito para realizar el programa de doctorado en Integración y modulación en señales en biomedicina - Farmacología.

Obtención del tercer año de beca de la Fundación Carolina en convenio con la Universidad San Francisco de Quito para realizar el programa de doctorado en Integración y modulación en señales en biomedicina - Farmacología.

Reconocimiento en la Universidad San Francisco de Quito por excelencia académica en la evaluación docente 2022-2023.