

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

**EFICACIA, TOXICIDAD Y FARMACOCINÉTICA EN VACAS CON MASTITIS  
CLÍNICA TRATADAS POR VÍA INTRAMAMARIA CON ENROFLOXACINA  
CLORHIDRATO-DIHIRATO**

TESIS

QUE OPTA POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MARCELA VIVEROS PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: LILIA GUTIÉRREZ OLVERA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

REYES LÓPEZ ORDAZ, UAM-X

CIUDAD ANIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico durante la permanencia en el programa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, con énfasis a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme la oportunidad de adquirir conocimiento científico y ético.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, por su amistad y ayuda en diferentes etapas de mi formación.

A mi comité tutoral: Dr. Héctor Sumano, Dra. Lilia Gutiérrez y el Dr. Reyes, por el tiempo, conocimiento y paciencia dedicada durante este proyecto.

Al propietario de la unidad de producción “Montoro” y al personal, por facilitar el uso de instalaciones y animales para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Ismael Martínez Cortes por su ayuda, amistad y asesoría.

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

21-Jun-2017

Dear Dr. Sumano,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Efficacy assessment of an intramammary treatment with a new recrystallized enrofloxacin vs. ceftiofur and parenteral enrofloxacin in dairy cows with non-severe clinical mastitis" in its current form for publication in the Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Yours sincerely,

Prof. Jim Riviere

Editor, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics

[jriviere@ksu.edu](mailto:jriviere@ksu.edu)

## RESUMEN

Se evaluó la forma recristalizada de enrofloxacin di hidrato-HCl (enro-C) sobre la eficacia clínica y bacteriológica para la cura de vacas Holstein-Friesian afectadas con mastitis clínica no severa. Los tratamientos fueron: enro-C<sub>susp</sub> (n = 81), se aplicó; una suspensión farmacéutica de enro-C /cuarto de la ubre; Grupo enro-C<sub>pd</sub> (n = 80) como se cita con anterioridad, pero utilizando enro-C polvo suspendido en agua; CF (n = 65), se aplicó ceftiofur HCl / cuarto y enroP (n = 66), se aplicó solución estándar de enrofloxacin (5 mg / kg, IM). Las vacas tuvieron una producción media de leche de 31 L / día y tenían entre 2 y 3 lactancias. Los tratamientos se administraron cada 24 h durante 3 días para todos los grupos. Los grupos tratados con enro-C presentaron cura clínica superior (P< 0.05) en comparación con los grupos tratados con CF o enroP (95.06%, 96.25%, 67.79% y 57.55%, para enro-C<sub>susp</sub>, enro-C<sub>pd</sub>, CF y enroP, respectivamente). En contraste, por la exclusión de casos debido a diagnóstico incompleto y con ello reducción de la n de los grupos, la probabilidad de cura bacteriológica no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos a nivel de P< 0.1. Sin embargo, las excelentes tasas de curación clínica y bacteriológica obtenidas para enro-C en los casos no graves de mastitis son superiores a los datos previamente informados para la enrofloxacin parenteral y otros tratamientos antibacterianos intramamarios de uso habitual. Las concentraciones máximas en leche obtenidas del grupo enro-C<sub>susp</sub> fue: 2.50 µg/ml y 2.14 µg/ml para el grupo enro-C<sub>pd</sub> y el comportamiento de la enro-C *in vitro* demostró no tener un efecto tóxico sobre células epiteliales de glándula mamaria. Por lo tanto, estos resultados permiten proponer como adecuado el tratamiento de mastitis clínica no-severa con enro-C.

Palabras clave: enrofloxacin-clorhidrato di hidrato (enro-C), mastitis, vaca, tratamiento, enrofloxacin.

## **Abstract**

A re-crystallized form of enrofloxacin as dehydrate-HCl (enro-C) was assessed for bacteriological and clinical cure efficacies in Holstein-Friesian cows affected of non-severe clinical mastitis. Treatments were: enro-C<sub>susp</sub> (n=81), treated with a pharmaceutical suspension of enro-C/quarter; group enro-C<sub>pd</sub> (n=80) treated as above, but using enro-C powder suspended in water; group CF (n=65), treated with ceftiofur HCl/quarter, and group enro<sub>P</sub> (n=66), treated with standard enrofloxacin solution (5 mg/kg, IM). Cows had a mean milk production of 31 L /day and were 2-3 lactational periods old. Treatments were administered every 24 h for 3 days. Groups treated with enro-C exhibited statistically significant ( $P > 0.05$ ) better clinical cure as compared to groups treated with CF or enro<sub>P</sub> (95.06%, 96.25%, 67.79% and 57.55%, for enro-C<sub>susp</sub>, enro-C<sub>pd</sub>, CF and enro<sub>P</sub>, respectively). In contrast, probability of bacteriological cure was not statistically different among treatments, having a  $P < 0.1$ . This was due to incomplete diagnosis and consequently reduction in the  $n$  value of all groups. Yet, the outstanding clinical and bacteriological cure rates obtained for enro-C for non-severe cases of mastitis is superior to previously reported data for parenteral enrofloxacin and other antibacterial-intramammary treatments. Impact of using enro-C on the rate and pattern of bacterial resistance, somatic cell counts and milk electric conductivity, must be studied. Also, the use of enro-C for complicated cases of mastitis should be studied and milk withdrawal times must be accurately established. The maximum concentrations in milk obtained from the enro-C<sub>susp</sub> group were: 2.50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 2.14  $\mu\text{g} / \text{ml}$  for enro-C<sub>pd</sub>. The *in vitro* behavior of enro-C showed no toxic effect on mammary gland epithelial cells. Hence, these results allow the proposal suitably treating non-severe cases of clinical mastitis with enro-C.

**Keywords: enrofloxacin-dihydrate hydrochloride (enro-C), mastitis, cow, treatment, enrofloxacin.**

## CONTENIDO

RESUMEN .....	4
Abstract .....	5
INDICE DE CUADROS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	15
2.1 Incidencia de la mastitis .....	15
2.2 Clasificación de la mastitis .....	16
2.3 Impacto económico de la mastitis .....	19
2.4 Diagnostico de mastitis .....	20
2.4.1 Prueba de California para mastitis (California Mastitis Test [CMT]) .....	21
2.4.2 Conductividad eléctrica (CE).....	22
2.4.3 Bacteriología .....	22
2.5 Tratamiento mastitis.....	23
2.5.1 Uso de enrofloxacin en el tratamiento de la mastitis .....	27
2.5.2 Enrofloxacin clorhidrato-dihidrato.....	28
2.6 Residuos en leche.....	29
2.6.1 Prueba microbiológica para detección de residuos.....	30
2.7 Evaluación de toxicidad celular por fármacos in vitro.....	31
III. HIPÓTESIS .....	33
IV. OBJETIVOS .....	34
V. MATERIALES Y METODOS.....	35
5.1 Animales y manejo.....	35
5.2 Criterios de inclusión.....	36
5.3 Tratamientos .....	36
5.4 Fármacos .....	37
5.5 Microbiología.....	39

5.6	Conteo celular somático y conductividad eléctrica .....	40
5.7	Toma de muestras y determinación de enrofloxacin.....	40
5.8	Ensayo microbiológico .....	41
5.9	Determinación de residuos por Delvotest® SP- NT .....	42
5.10	Cultivo de células .....	43
5.11	Tratamientos y determinación de toxicidad celular por citometría de flujo.	43
5.12	Análisis estadístico.....	44
5.13	Variables farmacocinéticas .....	46
VI.	RESULTADOS .....	48
6.1	Eficacia .....	48
6.2	Conteo celular somático y Conductividad eléctrica.....	49
6.3	Producción .....	52
6.4	Farmacocinética.....	52
6.5	Residuos .....	58
6.6	Toxicidad celular .....	60
6	DISCUSIÓN.....	63
7	CONCLUSIONES .....	73
8	REFERENCIAS .....	74



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de mastitis clínica .....	17
Cuadro 2. Principales cambios en producción y composición en leche causados por mastitis.....	18
Cuadro 3. Costos totales estimados por caso de mastitis clínica.....	20
Cuadro 4. Preparaciones antimicrobianas comerciales aprobadas por la FDA para administración IMM en vacas en producción y eficacia lograda en el tratamiento de mastitis clínica .....	26
Cuadro 5. Días de producción y números de lactancias, expresadas en promedio ( $\pm$ D.E) de las vacas Holstein-Friesian inscritas. ....	38
Cuadro 6. Formula de la suspensión para uso intramamario (enro-Csusp) .....	39
Cuadro 7. Edad, peso, días de lactación y numero de lactancia, expresadas en promedio ( $\pm$ D.E) de las vacas Holstein-Friesian inscritas en este ensayo .....	41
Cuadro 8. Clasificación de acuerdo con coloración en tubos del kit Delvotest® SP-NT .....	43
Cuadro 9. Bacterias aisladas de las vacas enroladas en el estudio (número / proporción de cada grupo) .....	50
Cuadro 10. Valores farmacocinéticos séricos de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato de dos diferentes presentaciones intramamarias, enro-Csusp y enro-Cpd en vacas con mastitis clínica, tratados con tres dosis cada 24 horas con 300 mg de enrofloxacin clorhidrato .....	54

Cuadro 11. Valor medio  $\pm$  desviación estándar de concentraciones de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato logradas en leche de glándulas con mastitis clínica, tratadas con 300mg enro-Csusp y enro-Cpd cada 24 horas, durante 3 días.  
..... 56

Cuadro 12. Concentraciones utilizadas para determinar límites de detección para enro-C de Delvotest® SP- NT en la leche de bovino ..... 58

Cuadro 13. Resultados obtenidos de muestras de leche mediante el kit Delvotest® SP- NT provenientes de 10 vacas Holstein- Friesian, posterior al tratamiento de mastitis clínica con enrofloxacin deshidratada-HCl /cuarto utilizando enro-Csusp, durante un periodo de 3 días a intervalos de 24horas ..... 59

Cuadro 14. Resultados obtenidos de muestras de leche mediante el kit Delvotest® SP- NT, provenientes de 10 vacas Holstein- Friesian, posterior al tratamiento de mastitis clínica con enrofloxacin deshidratada-HCl /cuarto utilizando enro-Cpd, durante un periodo de 3 días a intervalos de 24 horas ..... 60

Cuadro 15. Media y desviación estándar de células de glándula mamaria positivas a tinción Aqua Zombie™, obtenidas posteriormente al tratamiento con diferentes concentraciones de enro-C ..... 61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promedio $\pm$ 1D.E para conductividad eléctrica (A) y el conteo de células somáticas (B) en vacas curadas clínicamente en los días 7, 14 y 21. ....	51
Figura 2. Valor medio $\pm$ desviación estándar de concentraciones y halo de inhibición, obtenidos en ensayo microbiológico con Escherichia Coli .....	53
Figura 3. Valores medios de concentraciones séricas de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato, posterior a la administración intramamaria de 3 dosis de 300 mg de enro-Cpd y enro-Csusp cada 24 horas en vacas con mastitis clínica .....	55
Figura 4. Concentraciones de leche de enrofloxacin posteriores a administración intramamaria de 300 mg/20 ml de enro-C en vacas con mastitis clínica en dos presentaciones: enro-Csusp y enro-Cpd.....	57
Figura 5. Número total de células muertas (positivas a la tinción con Aqua Zombie™, obtenidas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de enro-C .....	62

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

AUC= Área bajo la curva de concentración contra tiempo

AUCt = Área trapezoidal bajo la curva de concentración contra tiempo

CCS= Conteo de células somáticas

CE = Conductividad eléctrica

CMT= Prueba de California para mastitis

C<sub>MAX</sub>= Concentración sérica máxima

DMEM= Medio esencial Eagle modificado por Dulbeco

FDA = Food and Drug Administration

IM = Aplicación intramuscular

IMM= Aplicación intramamaria

IIM= Infección intramamaria

LMR = Límite máximo de residuos

MRT = Tiempo medio de residencia

PBS = Solución buffer fosfato salino

SFB= Suero fetal bovino

T<sub>MAX</sub>= Tiempo en alcanzar la C<sub>MAX</sub>

T<sub>1/2β</sub> = Vida media de eliminación

SCN = Estafilococos coagulasa negativos

UFC= Unidades formadoras de colonias

## I. INTRODUCCIÓN

La mastitis en vacas lecheras es la enfermedad más prevalente y económicamente importante en las industrias dedicadas a este rubro de todo el mundo (Hill *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2015). Se ha estimado que hasta el 80% de los fármacos antibacterianos utilizados en una granja están destinados a tratar la mastitis clínica y a prevenir infecciones durante el período de vacas secas (Pol y Ruegg, 2007). Se ha calculado un costo de \$ 106 a \$ 867 USD / caso de mastitis, con base en el costo de la atención médica, la reducción de la producción de leche después y durante el tratamiento, el descarte de leche durante la enfermedad, el sacrificio prematuro de la vaca, las recaídas y la retirada de leche requerida (Bar *et al.*, 2007; Pinzón-Sánchez *et al.*, 2011). El éxito en el tratamiento de la mastitis es variable, ya que depende de diversos factores, algunos relacionados con la vaca, otros con el tratamiento elegido y con la existencia de patógenos resistentes en la granja (Bradley y Green, 2009). Es evidente entonces que existe una ventana de oportunidad para buscar nuevas alternativas antibacterianas para el tratamiento de infecciones intramamarias bacterianas (IIM) (Schukken *et al.*, 2013).

Las fluoroquinolonas no son consideradas como fármacos de primera opción para el tratamiento de IIM porque han sido consideradas como una de las últimas líneas de intervención antibacteriana, enfoque éste que en teoría ralentiza la aparición de resistencias bacterianas. Sin embargo, la marbofloxacin, administrada parenteralmente, ha demostrado poseer una farmacocinética y distribución favorables en la glándula mamaria (Schneider *et al.*, 2004) y la danofloxacin ha sido propuesta para el tratamiento de la mastitis causada por bacterias coliformes (Mestorino *et al.*, 2009). La enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina logran concentraciones útiles en la leche para tratar IIM, después de la administración parenteral de enrofloxacin (Kaartinen *et al.*, 1995). Sin embargo, la administración intramamaria de enrofloxacin no ha sido postulada para el

tratamiento de IIM, oficialmente por la Food and Drug Administration (FDA). En contraste, el uso parenteral de enrofloxacin ha sido aprobado en la Unión Europea para el tratamiento de diversas infecciones en ganado lechero, incluyendo mastitis por coliformes. No obstante, es improbable el uso de la mayoría de las preparaciones de enrofloxacin a través de la vía intramamaria, debido a que las presentaciones comerciales poseen un pH de 10.4 o superior (Sumano y Ocampo, 1995) y se sabe que un pH inferior a tres y superior a nueve no es adecuados para las preparaciones farmacéuticas intramamarias porque serían demasiado corrosivo para los tejidos (Mahadik y Kuchekar 2008; Aulton y Taylor, 2013). Se ha informado de un solo experimento usando enrofloxacin a través de la vía intramamaria y de manera combinada con gentamicina. Sin embargo, no fueron revelados ni el pH, ni la dosis, ni los vehículos utilizados. Los autores refieren una elevada eficacia en la cura clínica de IIM (Korudjiski *et al.*, 2009). A pesar de lo anterior, no existen preparados comerciales de enrofloxacin para administración intramamaria en América y la mayor parte de Europa.

En México existe disponible una nueva forma polimórfica recristalizada de enrofloxacin como clorhidrato-dihidrato (enro-C) (Patente 472715, INPI). Ha mostrado mayor solubilidad en agua que el compuesto original (Miranda-Calderón, 2014) y se ha demostrado que tiene una biodisponibilidad superior a la enrofloxacin de referencia en pollos de engorda (Gutierrez *et al.*, 2014) y hámsters (Carrascosa *et al.*, 2015). Como suspensión acuosa al 1.5%, la enro-C muestra un pH de 6 – 6.2 y se ha documentado de manera anecdótica que no irrita la glándula mamaria cuando se administra vía intramamaria, además de que logra concentraciones elevadas en la leche (Martínez-Cortés *et al.*, 2016). En este sentido vale la pena resaltar que para enrofloxacin es imperativo demostrar que se logran concentraciones elevadas del principio activo en el tejido problema y que tales concentraciones no sean perjudiciales a dicho tejido, en este caso a las células epiteliales de la glándula mamaria. La enrofloxacin es definido como un fármaco concentración-dependiente y por ello se requiere lograr concentraciones en el sitio de acción de diez a 12 veces el valor de la concentración inhibitoria mínima (CMI) del patógeno para lograr un efecto clínico óptimo contra el patógeno

particular o bien, que el área bajo la curva de concentración contra tiempo ( $AUC_{0-24}$ ) / CMI debe ser igual o superior a 125 ( $AUC_{0-24} / CMI \geq 125$ ) (Wright *et al.*, 2000).

Además de lo comentado y debido a que la enrofloxacin no se ha utilizado regularmente por vía IMM, es necesario tener conocimientos sobre la interacción del principio activo con el tejido secretor. Con anterioridad se han realizado estudios sobre el efecto de vehículos utilizados en tratamientos IMM sobre glándula mamaria in vivo (Pyörälä, 1987), utilizando indicadores de inflamación en leche y sobre el metabolismo y citotoxicidad de aflatoxina B1 en la glándula mamaria bovina *in vitro* (Caruso *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha evaluado con anterioridad el efecto de ningún fármaco sobre células de glándula mamaria. No obstante, cabe mencionar que los estudios *in vitro* sobre tejidos diana, es una tendencia creciente en el estudio de fármacos para uso humano (Yordanov *et al.*, 2013; Hebling *et al.*, 2015; Joshy *et al.*, 2016).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Incidencia de la mastitis

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria, principalmente pero no exclusivamente, en respuesta a una infección bacteriana intramamaria (IIM). Esta se caracteriza por el movimiento de los leucocitos y proteínas de suero de la sangre al sitio de la infección. La IIM es el resultado del paso de bacterias a través del conducto del pezón de un cuarto mamario, éstas se multiplican en las cisternas de pezones y glándulas y progresan hacia los tejidos productores de leche. La mastitis representa el problema de salud más prevalente en el ganado lechero (Hill *et al.*, 2009) y uno de los principales motivos para eliminar animales de manera prematura en los rebaños (Pol y Ruegg, 2007; USDA, 2007). Es de origen multifactorial y tanto para su presentación como para su cura influyen una gran cantidad de factores (Pinzón-Sánchez *et al.*, 2011).

Se han aislado diversos patógenos de la glándula mamaria bovina en casos de mastitis, tales como: bacterias, hongos, levaduras, algas y micoplasmas. Sin embargo, en la mayoría de las infecciones intramamarias el patógeno causal es una bacteria. Los microorganismos causales de la mastitis se clasifican en patógenos contagiosos y ambientales. Los primeros viven y se multiplican dentro de la glándula mamaria y la piel del pezón, su transmisión es principalmente de animal a animal mediante el ordeño. Ejemplos de estos son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* y *Corynebacterium bovis*. Por otro lado, los patógenos ambientales son considerados como agentes infecciosos oportunistas y se caracterizan por encontrarse de forma natural en el medio ambiente del animal. Los más comunes son: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* (Bradley *et al.*, 2007; Olde Riekerink *et al.*, 2008). Los estafilococos coagulasa negativos (SCN) se describen generalmente como patógenos ambientales menores; sin embargo, su impacto en la incidencia de mastitis clínica ha aumentado (Pyörälä y Taponen, 2009; Lago *et*



*al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2016), probablemente porque se reporta que las prevalencias de patógenos contagiosos principales están disminuyendo (Sampimon *et al.*, 2009; Lago *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2016).

## 2.2 Clasificación de la mastitis

La mastitis se puede clasificar de acuerdo con su forma de presentación como clínica y subclínica. Esta última se caracteriza por la presencia de patógenos con ausencia de signos clínicos ostensibles en la glándula mamaria. De hecho, la leche posee una apariencia normal, lo que la lleva a clasificarse como una presentación de difícil diagnóstico y con una elevada tendencia a evolucionar en caso crónico (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). El signo más evidente es un conteo de células somáticas elevado en el cuarto afectado y la presencia del patógeno en muestras de leche.

La mastitis clínica se caracteriza por dar lugar a un cuadro de signos que incluye: cambios en la apariencia de la leche (coagulación, leche engrosada o descolorida, con sangre, pus, escamas o coágulos), acompañado de signos propios de inflamación de la ubre como dolor enrojecimiento, hinchazón y fiebre. En algunos casos pueden coexistir signos de participación orgánica como fiebre, deshidratación, debilidad, inapetencia y en ocasiones se puede progresar a la muerte. (Royster y Wagner, 2015). En el Cuadro uno se presenta la clasificación de casos clínicos de acuerdo con el grado de inflamación y la presencia o ausencia de signos sistémicos.

La mastitis afecta de forma directa la calidad higiénica, nutricional y fisicoquímica de la leche, cambiando la composición de ésta en medida a la respuesta inflamatoria generada por la presencia de patógenos. Entre los cambios ocasionados por la mastitis se mencionan el aumento de la permeabilidad en los epitelios dañados que se refleja en aumento de flujo de iones, proteínas, enzimas y células fagocíticas hacia la luz alveolar, disminución de la capacidad de síntesis por parte de la glándula, aumento en el riesgo de presencia de patógenos en leche

y producción de sustancias relacionadas con la reacción inflamatoria, tal como proteínas de

**Cuadro 1. Clasificación de mastitis clínica**

<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>
<b>Leve</b>	Leche visualmente anormal (coágulos, copos, consistencia acuosa)
<b>Moderada</b>	Leche visualmente anormal y se detecta firmeza o hinchazón del cuarto afectado
<b>Severa</b>	Leche groseramente anormal, la firmeza o la hinchazón del cuarto afectado evidente y hay signos sistémicos como fiebre, deshidratación y / o depresión

Adaptado de (Royster y Wagner, 2015).

fase aguda que se detallan en el cuadro dos (Pyörälä, 2003; Forsbäck *et al.*, 2009; Bezman *et al.* 2015). Si bien durante la patogenia de la mastitis disminuye la síntesis de caseína por parte de la glándula mamaria, la concentración de proteínas totales en leche solo se ven afectada ligeramente debido al incremento de proteínas de origen sanguíneos como la albúmina, las inmunoglobulinas y la transferrina. Sin embargo, este incremento es evidente hasta que el recuento celular somático supera las 200,000 células/ mL de leche (Schällibaum, 2001).

Por otra parte, el contenido y la composición grasa de la leche varía durante la mastitis, con un incremento en los ácidos grasos libres y una disminución en la cantidad de fosfolípidos que se manifiesta con una reducción en el tamaño del glóbulo de grasa. Se ha reportado que la composición de la membrana del glóbulo de grasa cambia en un 10% con respecto a la leche provenientes de vacas no mastíticas. Esto se debe a un aumento en los ácidos grasos de cadena corta y a una disminución en los ácidos grasos de cadena larga (Schällibaum, 2001).

**Cuadro 2. Principales cambios en producción y composición en leche causados por mastiis**

Disminución	Grado de cambio	Incremento	Grado de cambio
Producción de láctea	---	CCS	+++
Ingesta de Materia seca	-	Proteínas de suero	+++
Lactosa	-	Albúmina de suero bovino	+
Grasa	-	Inmunoglobulinas	+++
Ácidos grasos de cadena larga	-	$\kappa$ caseína	++
Caseína total	--	Peptonas proteasa	++
$\alpha$ SI caseína	--	Ácidos grasos libres	++
$\beta$ caseína	---	Ácidos grasos de cadena corta	+
$\alpha$ lactoalbúmina	-	Sodio	++
$\beta$ lactoalbúmina	---	Cloro	++
Calcio	---	Lactato	+++
Magnesio	---	Actividad enzimática	
Fosforo	---	Lipasa	++
Zinc	-	Lisozima	+++
Potasio	-	NAGasa	+++
		$\beta$ Glucuronidasa	+++
		Plasmina	+++

---: Disminución e mayor grado; +++: Aumento en mayor grado. Adaptado de (Pyörälä, 2003)

### 2.3 Impacto económico de la mastitis

Ya se ha comentado que es la enfermedad más prevalente y económicamente importante en la industria lechera de todo el mundo (Hill *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2015) y se ha calculado que hasta el 80% de los fármacos antibacterianos utilizados en una granja están destinados a esta patología ya sea en el tratamiento de la mastitis clínica o en la prevención de infecciones durante el período de descanso lactacional (Pol y Ruegg, 2007). Sin embargo, la subestimación de los costos de la mastitis es típica entre los productores de leche, dado que no cuantifican todos los componentes del evento. Por ejemplo: los costos indirectos, como los inherentes al sacrificio prematuro y las pérdidas de producción a largo plazo inducidas por la mastitis. Se han determinado con anterioridad en diferentes estudios los costos generados en casos individuales de mastitis clínica. Los resultados presentados son muy variables dados los rubros que se cuantifican, debido a los costos indirectos que se incluyen en cada evaluación. En el cuadro tres se presentan diferentes estimaciones de costos por casos de mastitis clínica incluyendo: atención médica, costo de tratamiento, costo de diagnóstico bacteriológico, costo de reemplazo, reducción de la producción de leche después del tratamiento, descarte de leche durante el periodo de enfermedad, sacrificio prematuro de la vaca, recaídas en la patogenia y tiempo de retiro requerido en leche.

Posterior a casos de mastitis clínica se ha reportado que los animales afectados con esta patología no regresan al mismo volumen de producción y aunque pudiera percibirse que se mantiene un nivel de producción aceptable, éste es significativamente menor en un rango mínimo del 10-12 % en comparación con el nivel previo (Rajala-Schultz *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2004; Hagnestam *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los cuartos de la glándula mamaria presentan una capacidad reducida por parte del tejido secretor para la síntesis y secreción de leche. Esto se debe a una disminución en los porcentajes de las áreas ocupadas

por los alvéolos en el epitelio y un aumento del estroma inter-alveolar posterior a un cuadro de mastitis (Helmbolt *et al.*, 1953).

**Cuadro 3. Costos totales estimados por caso de mastitis clínica**

<b>Referencia</b>	<b>Costo estimado*</b>	<b>Costos indirectos</b>
Rodrigues <i>et al.</i> , 2005	\$ 91	Leche descartada, costo tratamiento, trabajo extra.
Bar <i>et al.</i> , 2008	\$ 179	Costo tratamiento, leche descartada, trabajo extra, pérdidas de leche, mortalidad
Pinzón-Sánchez <i>et al.</i> , 2011	\$ 743	Causada por Gram+, 2 días de tratamiento, sin cura bacteriológica, recurrencia, diagnostico, perdidas de leche, costos tratamiento, perdidas de leche por mastitis subclínica, costo de recurrencia.
Pinzón-Sánchez <i>et al.</i> , 2011	\$ 106 - \$ 867	Costo de tratamiento con antibacterianos, mano de obra, descarte de leche, pérdidas de volumen de producción debido a mastitis clínica y subclínica, cultivo bacteriológico, sacrificio y recurrencia

\*: Costo estimado en dólares.

Aunado a lo anterior el costo causado por mastitis impacta en sanciones financieras cuando el conteo celular somático (CCS) en leche del tanque recolector es demasiado alto.

#### 2.4 Diagnostico de mastitis

El diagnóstico de la mastitis clínica se basa en los signos clínicos de la enfermedad y se complementa mediante diferentes pruebas de diagnóstico, ya sea de uso común en campo o mediante pruebas de laboratorio. Entre las pruebas de campo destacan las que se basan en métodos físicos como palpación de la ubre y cuarto afectado, métodos químicos como conductividad eléctrica de la

leche y métodos biológicos como la prueba de California para mastitis. Las pruebas que requieren laboratorios se conocen las pruebas biológicas para determinación de conteo celular somático (CCS) con equipos especializados, la prueba microbiológica para aislamiento del patógeno causal, pruebas que se basan en la detección de enzimas o indicadores de inflamación y pruebas moleculares y serológicas.

#### 2.4.1 Prueba de California para mastitis (California Mastitis Test [CMT])

Una vez iniciado el proceso infeccioso que da lugar a la mastitis se desarrolla un incremento en la afluencia de células del sistema inmune y proteínas del torrente sanguíneo a la leche, lo que se ve reflejado en un aumento en el CCS. En vacas con glándulas sanas el CCS es < 200,000 células por mL (Akers y Nickerson 2011; Pilla *et al.*, 2013). La prueba de CMT es de uso habitual en las empresas lecheras y permite diagnosticar IIM indirectamente en las vacas lactantes. El fundamento de la prueba se basa en que los componentes del reactivo (un detergente y un indicador de pH, cuya función es romper las células) dejan salir el ADN fuera de la membrana celular y dado que estos filamentos de ADN forman estructuras tipo gel cuando se unen unos con otros, cuantas más células haya destruidas y existentes en la muestra problema, mayor será la infección y se espera que la muestra de lugar a una mayor reacción. El cambio de color indica la variación del pH de la leche. La prueba se realiza mezclando un volumen equivalente de leche y de reactivo. Cada muestra de leche perteneciente a un cuarto de la vaca se coloca en un pocillo limpio de una paleta para CMT. A medida que la placa se hace girar suavemente, cualquier cambio de color o la formación de un gel viscoso se interpreta conforme al siguiente rango: 0 para ninguna reacción, 1 para un rastro, un 2 positivo débil, un 3 positivo fuerte y el 4 se interpreta como una muestra fuertemente positiva (Schalm y Noorlander, 1957). La sensibilidad y la especificidad de CMT en la literatura es variable: Vijaya *et al.*, (1998) encontraron una sensibilidad del 71% y una especificidad del 75%. Sargeant *et al.* (2001) y Sanford *et al.* (2006), detectaron a los 3 días en la leche,

una capacidad de 56-57% y hasta el 70% para identificar cualquier infección intramamaria.

#### 2.4.2 Conductividad eléctrica (CE)

La CE de la leche se utiliza como método indirecto de diagnóstico de infecciones intramamarias. El fundamento de la prueba se basa en la capacidad de transporte de la corriente eléctrica entre dos electrodos, medida en millisiemens (mS) (Elizalde *et al.*, 2009). La concentración de aniones y cationes, con  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , determina la CE de la leche. En la glándula mamaria, las bombas de sodio se encuentran en la membrana baso-lateral de las células secretoras, su función es bombear  $\text{Na}^+$  hacia el líquido extracelular y  $\text{K}^+$  hacia el interior de las células. Tanto el  $\text{Na}^+$  como el  $\text{K}^+$  son transportados pasivamente, a través de la membrana apical. Además, una vía paracelular está presente en el epitelio, mediante ella  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se desplazan hacia la leche y  $\text{K}^+$  y lactosa se desplaza hacia el líquido extracelular (Peaker, 1973). Cuando una vaca es expuesta a una infección intramamaria, la CE de la leche aumenta debido a un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la leche (Kitchen *et al.*, 1980). Este aumento es causado por la destrucción de las uniones entre células y la activación del sistema de bombeo de iones. Como resultado del daño celular, iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son vertidos en el lumen de los alvéolos. Por lo que a mayor cantidad de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en leche mayor velocidad de conducción de la misma. En vacas lactantes, el valor de corte es normalmente  $> 5 \text{ mS} / \text{cm}$ . Existen, otros factores además de la mastitis, como paridad, la fase de lactancia, el intervalo de ordeño y la composición de la leche que pueden afectar la CE de leche. Por lo anterior, la CE se utiliza como medida complementaria en el diagnóstico de la mastitis y/o estado de salud de la glándula mamaria.

#### 2.4.3 Bacteriología

El aislamiento de bacterias en leche de animales con mastitis es considerado como el diagnóstico definitivo de IIM. La colección de muestras de leche en forma

aséptica para los exámenes bacteriológicos puede proveer un diagnóstico preciso para el tratamiento, pronóstico, prevención y control de la mastitis. Los métodos de identificación se basan en el cultivo microbiológico de la leche y en pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas. (NMC, 2004).

## 2.5 Tratamiento de la mastitis

Diversos fármacos se han utilizado y evaluado en el tratamiento de la mastitis. Entre ellos se incluyen antimicrobianos, antiinflamatorios, electrolitos, vitaminas, vacunas y terapias de tipo herbolario (Gruet *et al.*, 2001; Erskine *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de agentes antibacterianos sigue siendo el principal método para tratar las IIM en vacas y a la par es la principal razón para el uso de antibióticos en los establos lecheros (Pol y Ruegg, 2007a; Pol y Ruegg, 2007b). La eficacia del tratamiento de la mastitis clínica depende de diferentes factores relacionados a la vaca (edad, la etapa de lactancia, CCS alto antes del tratamiento, múltiples infecciones previas, etc.), el patógeno (especies causales y la presencia de resistencia antimicrobiana) y el tratamiento (concentraciones alcanzadas en sitio de infección, duración del tratamiento, elección de la vía de administración; actividad del principio activo en el medio y tiempo de permanencia en el sitio) (Pinzón-Sánchez y Ruegg, 2011; McDougall *et al.*, 2014, Degen *et al.*, 2015).

La tasa de eficacia de un antimicrobiano está condicionada por las concentraciones que éste alcanza en su sitio de acción, su liposolubilidad, los valores de pKa del agente antimicrobiano, la afinidad por el tejido, la formulación del vehículo usado y la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, expresada como concentración mínima inhibitoria (CMI) y/o concentración mínima bactericida (CMB) (Canut-Blasco *et al.*, 2015). Como se mencionó, un punto relevante es la actividad que muestre el antibacteriano en presencia de leche y material derivado de la infección, así como su unión a las proteínas de la leche, quelación por iones bivalentes (Ca y Mg), etc. (du Preez, 2000). Por ejemplo, los aminoglicósidos pierden casi por completo su actividad antibacteriana en presencia de leche y/o pus; las tetraciclinas se quelan con el calcio de la leche. La aparición de microorganismos multiresistentes obliga a un uso racional de los antimicrobianos y



a un diseño de formas farmacéuticas bien pensado. Por ello, la vía de administración resulta clave para obtener efectividad en el tratamiento de una IIM. Aunque parece obvio, no siempre se logra que los antimicrobianos estén incluidos en vehículos que logren que el principio activo difunda en la glándula mamaria por completo o que por sus características fisicoquímicas distribuya adecuadamente en la ubre y sea capaz de alcanzar el sitio de infección en concentraciones efectivas. Por ejemplo, el ceftiofur es un excelente antibacteriano para tratar IIM, pero solamente cuando se le aplica por vía mamaria pues por vía parenteral no alcanza concentraciones útiles para tratar estos problemas (0.2 µg/mL). Para el tratamiento de la mastitis bovina existen tres compartimentos farmacológicos donde los microorganismos pueden estar presentes y en los que se necesita que difunda el fármaco (Erskine *et al.*, 2003). El primer compartimiento se ubica en la parte apical de los alveolos, los ductos y la leche. Los microorganismos que típicamente residen en estos lugares y que se consideran no invasivos son el *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus disgalactiae* y el *Staphylococcus coagulasa* negativo. En esta región se necesita que el antibacteriano permanezca en la leche en concentraciones efectivas, siendo la forma más fácil y efectiva de lograrlo con la administración intramamaria del fármaco. (Erskine *et al.*, 2003). El otro compartimiento se refiere al parénquima mamario en donde se encuentran microorganismos invasivos como el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus uberis*. En estos casos se considera que las vías parenterales o sistémicas pueden lograr que el fármaco difunda a estos tejidos y así servir de apoyo a la vía intramamaria (Erskine *et al.*, 2003). El tercer compartimiento es el animal, el cual es afectado generalmente por bacterias coliformes que además de producir mastitis, son capaces de invadir el torrente circulatorio originando una septicemia caracterizada por fiebre, hipotensión y choque. (Gruet *et al.*, 2001)

La administración intramamaria de fármacos es la vía de preferencia en el tratamiento de IIM (Gruet *et al.*, 2001; Kalmus *et al.*, 2014) ya que ofrece ventajas potenciales, entre las que incluyen: concentraciones altas de fármaco en el sitio de infección, sin o con poca absorción sistémica, evitando así efectos secundarios no deseados. Además, no se tiene acceso del antibacteriano a la flora intestinal, lo

que es más favorable desde el punto de vista de disminuir la generación de resistencias bacterianas y limita la problemática de los residuos tisulares no mamarios (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). Por añadidura, la dosis total de antimicrobianos administrados por vía IMM es considerablemente inferior a la del tratamiento parenteral y se evitan inyecciones dolorosas (Gruet *et al.*, 2001; Kalmus *et al.*, 2014).

Los porcentajes de eficacia en el tratamiento con antibacterianos para la mastitis clínica han sido variables y estos han ido decreciendo con los años (Cuadro cuatro). Aunque se prefieren antibacterianos beta-lactámicos y macrólidos para tratar IIM, se ha evaluado el uso de fluoroquinolonas repetidamente debido a su capacidad de difundir en glándula mamaria (Kaartinen *et al.*; 1995, Hoeben *et al.*, 2000; Rantala *et al.*, 2002; Poutrel *et al.*, 2008; Attil *et al.*, 2016). Los resultados no pueden considerarse como concluyentes.

En cuanto a la administración intramamaria, es importante conocer la farmacocinética del fármaco a utilizar, con el fin de buscar la optimización de los regímenes terapéuticos y alargar la vida útil de los antimicrobianos, la contención en la generación de bacterias resistentes y el establecimiento de tiempos de eliminación. Las muestras de leche y la extracción de sangre, a menudo se emplean *in vivo* para evaluar las concentraciones locales y sistémicas de los antimicrobianos. Existen diferentes técnicas para determinar la presencia y concentración de fármacos en diferentes fluidos, entre ellas se encuentra el método microbiológico (Bennett *et al.*, 1996). En el caso particular de la enrofloxacin se ha demostrado en diversos artículos que existe una equivalencia de resultados obtenidos a partir de esta prueba, con los logrados mediante cromatografía líquida de alta resolución (Souza *et al.*, 2004; Blondeau *et al.*, 2012; Badawy *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, la técnica microbiológica es más económica, pero sobre todo permite la detección de la porción microbiológicamente activa de los antimicrobianos.

**Cuadro 4. Preparaciones antimicrobianas comerciales aprobadas por la FDA para administración IMM en vacas en producción y eficacia lograda en el tratamiento de mastitis clínica**

<b>Nombre comercial (ingrediente activo)</b>	<b>Dosificación</b>	<b>Eficacia clínica</b>	<b>Eficacia bacteriológica</b>
Amoxi-Mast® (62.5 mg amoxicilina)	c/12 h, 3 Tx consecutivos	Guterbock <i>et al.</i> , 1993 (67.6 %) Roberson <i>et al.</i> , 2004 (57%)	Guterbock <i>et al.</i> , 1993 (43.9 %)
Dariclox® (200 mg cloxacilina sódica)	c/12 h, 3 Tx consecutivos	-	-
Hetacin-K® (hetacilina potásica 62.5 mg)	c/24 h, 3 Tx consecutivos	-	-
ToDay® (200 mg cefapirina sódica)	c/12 h, 2 Tx consecutivos	Guterbock <i>et al.</i> , 1993 (66.7 %) Schukken <i>et al.</i> , 2013 (Gram +: 65 %. Gram-: 50 %)	Guterbock <i>et al.</i> , 1993 (55%) Rosenberg <i>et al.</i> , 2002 (53%); Schukken <i>et al.</i> , 2013 (Gram +: 68 %. Gram-: 50 %)
Pirsue® (50mg Pirlimicina Clorhidrato)	c/24 h, 2- 8 Tx consecutivos	Pirlimicin FOI: (48%)	-
Spectramast® (125mg ceftiofur clorhidrato)	c/24 h, 2- 8 Tx consecutivos	Schukken <i>et al.</i> , 2013 (Gram +: 62 %. Gram-: 44 %) Ceftiofur FOI, 2005, (78.6 %)	Schukken <i>et al.</i> , 2013 (Gram +: 67 %. Gram-: 79 %), Ceftiofur FOI (70.4 %) Oliver <i>et al.</i> , 2004 (2d) 39%, (5d) 54%, (8d) 66%

### 2.5.1 Uso de enrofloxacin en el tratamiento de la mastitis

La enrofloxacin es un antibacteriano de uso exclusivo en medicina veterinaria, clasificado para efectos de farmacocinética / farmacodinámica (PK/PD) como concentración-dependiente. Pertenece a la familia de las fluoroquinolonas fluorinadas (de tercera generaci3n en Latinoam3rica) y est3 aprobada para uso en ganado lechero en la Uni3n Europea y Estados Unidos. La enrofloxacin es un cristal de color amarillo claro, soluble en KOH, 3cido ac3tico glacial y casi insoluble en agua a pH 7 (0,6 mg / ml) (Karanam y Choudhury, 2013). En soluci3n 3cida o alcalina, la enrofloxacin puede existir en cuatro formas: como un cati3n acido, una especie neutra no ionizada, un zwitteri3n intermedio, y un ion b3sico, esto dependiendo del pH del medio. Resalta en esta mol3cula, una alta biodisponibilidad, una excelente penetraci3n en el tejido y un amplio espectro antibacteriano, junto con una actividad bactericida contra Gram positivos y Gram negativos. La enrofloxacin altera la acci3n de la ADN-girasa bacteriana, una topoisomerasa del tipo II. Esta enzima est3 implicada en el desenrollado, el corte y el resellado del ADN. Hay dos subunidades de ADN girasa: subunidad A y subunidad B. La enrofloxacin act3a sobre el locus nalA de la subunidad A. La inhibici3n de la girasa conduce a las bacterias a la muerte. Aunado a lo anterior se ha estudiado que las fluoroquinolonas y espec3ficamente la enrofloxacin pueden tener efectos inmunomoduladores positivos aumentando la capacidad de los neutr3filos para combatir a los pat3genos (Hoeben *et al.*, 1998; Jerjomiceva *et al.*, 2014). El uso correcto de este medicamento antibacteriano requiere lograr las proporciones PK/PD 3ptimas. Esto es: la concentraci3n m3xima (C<sub>max</sub>) debe alcanzar 10-12 veces el valor de la concentraci3n m3nima inhibitoria (CMI) del pat3geno que se desea tratar (C<sub>max</sub> > 10-12 CMI) y el 3rea bajo la curva de concentraci3n contra tiempo en 24 horas (AUC<sub>0-24</sub>) / CMI debe ser igual o superior a 125 (AUC / CMI ≥ 125) (Wright *et al.*, 2000). El metabolismo de la enrofloxacin var3a entre especies. Aunque la enrofloxacin es un antibi3tico activo, puede producirse biotransformaci3n a su metabolito activo: la ciprofloxacin.

Normalmente la enrofloxacin es administrada por vía IM a dosis de 5 mg/kg y con ello se alcanza concentraciones altas y sostenidas de la misma y su metabolito ciprofloxacina en sangre, alcanzando concentraciones de 2 a 2.5 µg/mL en leche (Rantala *et al.*, 2002; Sumano *et al.*, 2002). Estas concentraciones en leche son normalmente suficientes para patógenos habituales de la mastitis (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* no resistente, *Streptococcus agalactiae* y *Strep. dysgalactiae*). Se han demostrado notables diferencias en bioequivalencias entre muchas marcas de enrofloxacin (Sumano *et al.*, 2001) y a menudo estas concentraciones no se logran (Sumano *et al.*, 2002). Adicionalmente, la mayoría de los antibacterianos disminuyen su eficacia en presencia de leche y secreciones relacionadas con el proceso inflamatorio-infeccioso y la enrofloxacin no es la excepción, aunque si es uno de los que menos se afectan. Se estima que la reducción en la capacidad antibacteriana puede llegar a ser hasta de un 70%. De tal suerte que en condiciones reales la eficacia clínica de la enrofloxacin se deberá a tan solo 0.6 a 0.96 µg/mL del principio activo en leche (Fang y Vinkepoor, 1995). Por otro lado, la enrofloxacin (y para tal caso ninguna fluoroquinolona conocida) no puede administrarse vía intramamaria dado el pH que se requiere para disolver este fármaco (al menos 10.5). Medicamentos con pH inferior a 3 o superior a 9, no son adecuados para la administración parenteral ni para las preparaciones farmacéuticas intramamarias porque serían demasiado corrosivas para los tejidos (Mahadik y Kuchekar 2008; Aulton y Taylor, 2013). A pesar de esto, la investigación del uso de enrofloxacin en el tratamiento de la mastitis ha ido en aumento en los últimos años y se ha postulado como un fármaco útil para el tratamiento de mastitis causadas por *Escherichia coli* (Rantala *et al.*, 2002; Soujala *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2016).

#### 2.5.2 Enrofloxacin clorhidrato-dihidrato.

La enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C – UNAM, patente 472715 (Instituto Mexicano de la Protección Industrial, México D.F. 2013) es una nueva forma polimórfica recristalizada de enrofloxacin que ha mostrado mayor solubilidad en agua (Miranda-Calderón *et al.*, 2014) y presenta una biodisponibilidad superior a la

enrofloxacin de referencia en pollos de engorde (Gutiérrez *et al.*, 2014) y hámsters (Carrascosa *et al.*, 2015), en comparación con el compuesto original. Como una suspensión al 1,5%, la enro-C muestra un pH de 6-6,2 y se ha informado que no irrita la glándula mamaria cuando se administra intramamariamente. La enro-C alcanza altas concentraciones en leche (Martínez-Cortés *et al.*, 2016). En estudios anteriores se logró una eficacia del 75% con enro-C en casos crónicos de mastitis por *Staphylococcus aureus* coagulasa-negativo, administrada por vía intramamaria diariamente a razón de 300 mg/glándula por 8 días seguidos (Martínez-Cortés *et al.*, 2016).

## 2.6 Residuos en leche

Los parámetros de calidad de leche se enmarcan en la regulación del *Codex alimentarius* que por una parte reconoce la calidad higiénico-sanitaria con base en la ausencia de microorganismos y un bajo recuento de células somáticas (CCS), y define la inocuidad del alimento como la ausencia de contaminantes que puedan afectar la salud humana, ya sean residuos derivados de medicamentos veterinarios o sustancias provenientes del entorno animal (micotoxinas, insecticidas, metales pesados, etc.).

La presencia de inhibidores provenientes del tratamiento antimicrobiano de los animales en productos lácteos sigue siendo una problemática, por lo que múltiples medidas se han establecido para prevenir este problema. Sin embargo, la ocurrencia de residuos antimicrobianos en la leche sigue siendo una situación frecuente. Las principales causas de la persistencia de residuos de antibióticos en la leche son la administración de medicamentos no recomendados, farmacocinética no establecida de productos comerciales, error en dosis administrada y la falta de cumplimiento con el tiempo de retiro establecido (McEwen *et al.*, 1991). Actualmente, los residuos más importantes que aparecen en la leche son los producidos por medicamentos antimicrobianos (antibióticos, sulfonamidas, quinolonas) usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y en especial de la glándula mamaria (Faria *et al.*, 2005). Residuos excesivos en los productos acabados resultantes pueden representar un riesgo para la salud de

los consumidores, incluidas las reacciones alérgicas y la generación de resistencia a los antibióticos. El reglamento (EU) N° 37/2010 establece que los límites máximos de residuos (LMR), son aquellas concentraciones permitidas de un principio activo en alimentos de origen animal que al ser ingerido por el ser humano no constituya ningún riesgo para la salud y se expresa generalmente como  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o partes por billón (ppb). La suma de enrofloxacin y ciprofloxacina en leche de vaca no debe superar los  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

En el mercado existen diversos estuches de pruebas rápidas para la detección de residuos en leche, sus diferentes principios de detección incluyen microbiológicos (Le Breton *et al.*, 2007) o interacciones bioquímicas (Reybroeck *et al.* 2010). Sin embargo, las pruebas basadas en la detección de inhibidores microbianos son las más utilizadas, debido a la obtención de resultados rápidos, fáciles de usar, bajo costo y pueden detectar un amplio espectro de compuestos.

#### 2.6.1 Prueba microbiológica para detección de residuos

Delvotest® SP-NT (DSM- Especialidades alimenticias) es una prueba de inhibición microbiológica de amplio espectro. Consiste en la inhibición del crecimiento, el agar sólido contiene un número estandarizado de esporas bacterianas *Bacillus stearothermophilus*, nutrientes para crecimiento y un indicador de pH, púrpura de bromocresol, el cual se somete a un periodo de incubación de 3 horas a  $64^{\circ}\text{C}$ . Durante el proceso de incubación de la muestra en el caso de que esta sea negativa a sustancias inhibitorias, el metabolismo microbiano resulta en un cambio en el pH, y por lo tanto en un cambio de color de púrpura a amarillo. Por el contrario, si la muestra contiene suficiente concentración de sustancias inhibitorias, el crecimiento y metabolismo de la bacteria será inhibido y el color se mantendrá púrpura. Se utiliza principalmente para la detección de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y también se afirma que detecta algunas sulfonamidas, aminoglucósidos, macrólidos y rifamicinas en una sola prueba (Bion *et al.*, 2015). Es considerada una prueba muy sensible (Stead *et al.*, 2008; Bion *et al.*, 2015), por lo que un resultado, es generalmente considerado como garantía de ausencia de residuos antimicrobianos. A pesar de lo anterior, diferentes autores han

señalado que los productos microbiológicos comerciales actuales utilizando *Bacillus stearotherophilus* no detectan residuos de quinolonas en la leche (Linage *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2005). Sin embargo, estos estudios se realizaron en leche proveniente de ovinos y caprinos.

## 2.7 Evaluación de toxicidad celular por fármacos *in vitro*

Los modelos experimentales basados en células epiteliales *in vitro* se han propuesto como una opción para abordar investigaciones de una forma más económica y ética (Matitashvili *et al.*, 1997) con relación a los estudios *in vivo*. Estudios *in vitro* en glándula mamaria de rumiantes se orientaron principalmente al conocimiento del metabolismo mamario. En los últimos años, se han realizado progresos sobre la comprensión de los mecanismos moleculares y su función en la glándula mamaria del rumiante, mecanismos implicados en la proliferación y diferenciación celular o mecanismos aplicados para estudiar los patógenos, sus productos y las interacciones de en los tejidos mamaros (Matitashvili *et al.*, 1997; Anaya-López *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Alva-Murillo *et al.*, 2016). Con anterioridad se han realizado estudios sobre el efecto de vehículos utilizados en tratamientos IMM sobre glándula mamaria (Pyörälä, 1987), utilizando indicadores de inflamación en leche y sobre el metabolismo y citotoxicidad de la aflatoxina B1 en la glándula mamaria bovina (Caruso *et al.*, 2009). Sin embargo, los efectos de fármacos en las células de la glándula mamaria no se han evaluado con anterioridad y los estudios *in vitro*, sobre tejidos diana es una tendencia creciente en el estudio de fármacos para uso humano (Yordanov *et al.*, 2013; Hebling *et al.*, 2015; Joshy *et al.*, 2016). Esta técnica permite llevar a cabo una amplia gama de investigaciones a nivel tisular, celular, bioquímico y molecular, extendiendo de esta forma el conocimiento acerca de diversos procesos de interacción de los fármacos y las células. La muerte celular por toxicidad es un mecanismo fisiológico crítico en múltiples procesos biológicos, que puede ser útil para el organismo. La toxicidad celular resulta usualmente en la muerte celular por apoptosis, la cual se caracteriza por criterios morfológicos y bioquímicos. Morfológicamente, la célula se contrae y se vuelve más densa; la cromatina se vuelve picnótica y se empaqueta



cerca de la membrana celular creando imágenes descritas como en media luna o herradura de caballo. El núcleo se fragmenta y la célula emite brotes (*blebbing*), que contienen fragmentos nucleares y citoplasmáticos, estos se desprenden de las células, formando los cuerpos apoptóticos (Strange *et al.*, 1992). Ocurre una translocación de fosfatidilserina del interior de la membrana celular al exterior. (Kroemer *et al.*, 2009). Debido a que la apoptosis implica un gran número de reacciones bioquímicas y eventos secuenciales, proporciona muchos puntos de control celular y presupone una notable señalización celular. Existen muchos métodos diagnósticos de apoptosis basados en la detección de fosfatidilserina extracelular en membrana plasmática, la permeabilización, la fragmentación de ADN y la activación de caspasas intracelulares. Entre las técnicas destaca la citometría de flujo como una de las más populares (Hebling *et al.*, 2015; Joshy *et al.*, 2016).

### III. HIPÓTESIS

- I. El tratamiento intramamario de dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg /cuarto posee una mayor eficacia clínica y/o bacteriológica en el tratamiento de la mastitis clínica no complicada bovina en comparación con los tratamientos habituales en un sistema de manejo intensivo.
- II. El tratamiento intramamario de dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg / cuarto reduce el número de células somáticas y conductividad eléctrica en leche posterior al tratamiento de mastitis clínica no complicada, en comparación con los tratamientos habituales en un sistema de manejo intensivo.
- III. El tratamiento intramamario de mastitis clínica no complicada con dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg / cuarto reduce la baja en la producción de leche posterior al tratamiento de mastitis clínica en comparación con los tratamientos habituales.
- IV. La administración intramamaria de enro-C a dosis de 300 mg/ cuarto en animales con mastitis clínica no complicada, genera concentraciones terapéuticas de la fluoroquinolona en leche, suficientemente elevadas para ser consideradas como terapéuticas.
- V. La citotoxicidad in vitro de enro-C en células epiteliales de glándula mamaria es nula en concentraciones máximas logradas con el tratamiento de mastitis clínica no complicada mediante el preparado con enro-C intramamario.

#### IV. OBJETIVOS

1. Realizar tratamientos intramamarios con dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg /cuarto y evaluar su eficacia clnica y/o bacteriolgica en el tratamiento de la mastitis clnica no complicada bovina en comparaci3n con los tratamientos habituales en un sistema de manejo intensivo.
2. Evaluar si el tratamiento intramamario con dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg / cuarto reduce el nmero de c3lulas som3ticas y conductividad el3ctrica en leche posterior al tratamiento de mastitis clnica no complicada, en comparaci3n con los tratamientos habituales en un sistema de manejo intensivo.
3. Determinar si el tratamiento intramamario de mastitis clnica no complicada con dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato (enro-C) a dosis de 300 mg / cuarto reduce la baja en la producci3n de leche posterior al tratamiento de mastitis clnica en comparaci3n con los tratamientos habituales.
4. Investigar mediante un estudio farmacocin3tico de la aplicaci3n IMM si la administraci3n intramamaria de enro-C a dosis de 300 mg/ cuarto en animales con mastitis clnica no complicada, genera concentraciones terap3uticas de la fluoroquinolona en leche, suficientemente elevadas para ser consideradas como terap3uticas.
5. Determinar si existe citotoxicidad a c3lulas epiteliales de gl3ndula mamaria *in vitro*, de varias concentraciones de enro-C.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Animales y manejo.

El presente trabajo se realizó durante los meses de mayo a septiembre de 2016, en un establo lechero tecnificado ubicado en la ciudad de Aguascalientes, Ags., en la zona centro de México, el clima de la región es semiseco. El cual posee aproximadamente 3,300 vacas Holstein / Friesian, en producción, con un promedio 10,000 kg de leche por lactación. Las cuales se encontraban agrupadas de acuerdo a su nivel de producción, etapa del período de lactación y número de lactaciones anteriores que son monitoreadas mediante con un sistema de identificación electrónica individual y el uso de podómetros (Afimilk® Israel). El ordeño tuvo lugar tres veces al día. Se utilizaron 292 vacas en estado de producción, de diferente número de partos (rango de 1- 4), las cuales fueron alimentadas con una ración totalmente mezclada, según las recomendaciones establecidas por el NRC (2001).

Los animales que fueron detectados con signos de mastitis clínica durante el ordeño, fueron registrados en reportes correspondientes a cada turno de ordeño, señalando el cuarto afectado y el número del animal, posteriormente fueron separados y trasladados a un corral exclusivo para animales que presentan esta patología, todos los animales se sometieron al protocolo de revisión para mastitis establecido por el establo, el cual consiste en la revisión previa de la ficha clínica del animal, seguido por un examen clínico. Los casos clínicos fueron clasificados de acuerdo con la escala propuesta por Royster y Wagner (2015), la cual se basa en la presencia o ausencia de signos locales y sistémicos.

El diagnóstico de eficacia clínica del tratamiento se realizó al terminar los protocolos de tratamiento de 3 días y previo a que el animal se reincorporara al corral de producción correspondiente (4 días posteriores a la aplicación del último tratamiento), mediante la palpación y el resultado en la prueba de California (grado de gelificación menor a 2).

## 5.2 Criterios de inclusión

Las vacas seleccionadas para este ensayo presentaron signos clínicos de mastitis y posible infección intramamaria (IIM), como reducción de la producción de leche, alteración de la apariencia de la leche (presencia de coágulos, copos, consistencia acuosa), fueron positivas a la Prueba de Mastitis de California (CMT) con un grado mayor de 2 según el método descrito por Schalm y Noorlander (1957). La paridad de las vacas osciló entre 1-4, cuando a los animales no se les administró tratamiento previo en un periodo de 60 días. Las vacas excluidas del ensayo fueron: casos graves de mastitis, animales con lesiones y deformidades en los pezones, infección en más de un cuarto o presencia de una enfermedad paralela y vacas cuyo período de vaca seca se programó en 60 días posteriores a la fecha de inclusión.

## 5.3 Tratamientos

Una vez que se diagnosticó un caso de mastitis clínica no severa, se asignó a través de un generador de números aleatorios, a uno de los 4 diferentes tratamientos: preparación farmacológica enro-C 1.5% (n = 81 vacas) administrada por vía intramamaria (IMM) a una concentración de 300 mg de la suspensión en un volumen de 20 ml / cuarto (grupo enro-C<sub>susp</sub>); Enro-C como polvo (n = 80 vacas) tratado con enro-C / suspendido mediante agitado vigoroso en agua estéril *in situ* y administrado por vía IMM como para enro-C<sub>susp</sub> (grupo enro-C<sub>pd</sub>); Grupo CF (n = 65 vacas) tratados vía IMM con 125 mg de suspensión de ceftiofur HCl en 10 mL (Spectramast®, Zoetis, Ciudad de México). Un cuarto grupo (n = 66), tratado vía intramuscular (IM) a dosis de 5 mg / kg de peso corporal de enrofloxacin de Baytril® 5% ® (Bayer, México City) (enroP). El volumen total de esta preparación se dividió en 4 sitios de inyección en las zonas glútea y del cuello. Todos los tratamientos se administraron una vez al día durante tres días. Los tratamientos intramamarios se realizaron después del ordeño y posterior de una limpieza completa de la glándula afectada; consecutivo la punta del pezón correspondiente a la glándula afectada se limpió con una solución antiséptica a

base de dióxido de cloro (Encore Pre-PostMR, ABS, México). A continuación, se dejó secar la glándula y se limpió el meato del pezón con una almohadilla infundida con alcohol. Los tratamientos se depositaron a mitad de camino en el pezón, sin masajear la glándula. Los detalles de cada tratamiento aplicado y las características principales de los grupos se presentan en el Cuadro cinco.

#### 5.4 Fármacos

La preparación farmacéutica intramamaria (enro-C<sub>susp</sub>) y la suspensión de enro-C (enro-C<sub>pd</sub>) se formularon periódicamente en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y tanto el fármaco como la preparación farmacéutica de enro-C se sintetizaron o se prepararon según los lineamientos de la Normativa Mexicana (NOM-012-ZOO-1993). Se prepararon lotes de 200 ml de la preparación en suspensión de enro-C y se almacenaron durante no más de 2 semanas. La cual presentó un pH de 5.5 y se elaboró de acuerdo con la formulación del Cuadro seis y el procedimiento siguiente: se preparó un lote de clorhidrato de dihidrato de enrofloxacin recrystalizado como se describe en la patente 472715 (Instituto Mexicano de Protección Industrial, México). Para obtener una micro-suspensión, se añadieron secuencialmente transcitol HP (Gatteffose, Químicos Lyontec, Ciudad de México), sorbitol (Farmacia París, Ciudad de México), goma xantana, polivinilpirrolidona K30, propilenglicol, ácido acético y manitol (Ashland, Ciudad de México) se lleva la suspensión a una concentración de 1,5% de enro-C en agua mediante un Ultraturax IKA T25-Digital (propulsor OSD-20 BOECO, Alemania) durante 30 min. El tamaño de partícula fue comprobado mediante la media de tres repeticiones de una muestra del mismo lote con el equipo (Zetasizer-nano, MALVERN®). La suspensión final se envasó en un ambiente estéril en jeringas para aplicación intramamaria.

**Cuadro 5. Días de producción y números de lactancias, expresadas en promedio ( $\pm$ D.E) de las vacas Holstein-Friesian inscritas.**

Tratamiento	Dosis/ Vía de administración	Número de vacas	Días en producción	Promedio de producción(Lt.) *	Media lactación	N°. Lactancia	Proporción de vacas (%)
<b>enro-C<sub>susp</sub></b>	300 mg/ 20 ml intramamaria	81	150 $\pm$ 92	34.03 $\pm$ 7.93	2 $\pm$ 1.11	1	28 (34.56 %)
						2	27 (33.33 %)
						3	18 (22.22 %)
						$\geq$ 4	8 (9.87 %)
<b>enro-C<sub>pd</sub></b>	300 mg/ 20 ml intramamaria	80	165 $\pm$ 45	34.89 $\pm$ 7.5	2 $\pm$ 1.20	1	27 (33.75 %)
						2	27 (33.75 %)
						3	20 (25.00 %)
						4	6 (7.50 %)
<b>CF</b>	125 mg/10 ml intramamaria	65	184 $\pm$ 80	34.52 $\pm$ 7.03	2 $\pm$ 1.30	1	23 (35.38 %)
						2	22 (33.84 %)
						3	17 (26.15 %)
						$\geq$ 4	3 (4.61 %)
<b>enroP</b>	5 mg/kg intramuscular	66	168 $\pm$ 87	35.43 $\pm$ 7.31	2 $\pm$ 1.51	1	24 (36.36 %)
						2	21 (31.81 %)
						3	17 (25.75 %)
						$\geq$ 4	4 (6.06 %)

\*Promedio de producción semanal registrado por el programa (Afimilk® Israel)

**Cuadro 6. Formula de la suspensión para uso intramamario (enro-Csusp)**

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad Unitaria</b>	<b>Cantidad por lote</b>	<b>%</b>
Clorhidrato de enrofloxacin	0.30 g	45.00 g	1.50
Equivalente a enrofloxacin			
Transcutol HP	1.00 mL	150.00 mL	5.00
Propilenglicol	2.00 mL	300.00 mL	10.00
Manitol polvo	2.00 g	300.00 g	10.00
Polividona K-30	1.00 g	150.00 g	5.00
Ácido acético	0.04 mL	6.00 mL	0.20
Agua c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.
<b>TOTAL</b>	<b>20.00 mL</b>	<b>3000.00 mL</b>	<b>100</b>

Para el tratamiento del grupo enro-C<sub>pd</sub> se llevó a cabo añadiendo 20 ml de agua desionizada estéril a una botella con tapa que contenía 300 mg de enro-C como polvo. La mezcla se agitó vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos y la suspensión recién formada se recogió con una jeringa de 50 ml. Se adaptó una punta intramamaria y después se administró la suspensión en el pezón correspondiente a la glándula afectada como se ha descrito previamente. Esta suspensión tenía un pH de 6,2.

### 5.5 Microbiología

Para el análisis bacteriológico, se obtuvieron muestras después del descarte de los tres primeros chorros de leche y posterior al ordeño el día del diagnóstico de mastitis clínica y a los siete, 14 y 21 días posteriores a la aplicación del tratamiento. Según las directrices del National Mastitis Council (NMC, 2004), muestras de 10 ml se recogieron en tubos de ensayo estériles y se transportaron inmediatamente al laboratorio para análisis microbiológico a una temperatura 3-4°C. Previó al proceso las muestras se sometieron a un proceso de agitación



mediante un vórtex durante un período de 5 minutos con el objetivo de obtener una muestra homogénea; posteriormente se diseminaron 30  $\mu$ l de inóculo en placas de agar sangre y MacConkey y se incubaron en condiciones aerobias a 37 ° C durante 24 y 48 horas. Después de este tiempo se examinaron las placas para el crecimiento microbiano. Las colonias se clasificaron de acuerdo con su morfología, reacción a tinción de Gram, actividad catalasa y coagulasa, producción de termonucleasa y fermentación anaeróbica (glucosa y manitol). Los aislados con colonias sospechosas de ser estafilococo, se confirmaron o no, basándose en la reacción de catalasa y en la morfología microscópica. Las colonias de *Staphylococcus aureus* se diferenciaron de otros estafilococos por medio de reacciones de manitol y coagulasa, según los lineamientos (NMC, 2004). Si más de tres bacterias diferentes fueron identificadas la muestra se consideró como contaminada y fue excluida del estudio.

#### 5.6 Conteo celular somático y conductividad eléctrica.

Los recuentos de células somáticas se obtuvieron mediante el dispositivo De Laval DCC® (De Laval DCC®, Suecia) mediante muestras tomadas previas al tratamiento correspondiente como se cita con anterioridad y en los días siete, 14 y 21 posteriores a la última aplicación de este, las pruebas se trabajaron siguiendo las directrices del proveedor. La conductividad eléctrica (CE) se midió durante el ordeño (MPC Afikim®, Israel) registrando el mayor valor como milisegundos / centímetro, previo al tratamiento y los días siete, 14 y 21 posteriores a la última aplicación del mismo.

#### 5.7 Toma de muestras y determinación de enrofloxacin

Muestras de sangre y leche se obtuvieron de 20 vacas Holstein Friesian con mastitis clínica (n=10) de forma aséptica y mediante el procedimiento citado con anterioridad. Los animales fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos las características de cada grupo enro-C<sub>pd</sub> y enro-C<sub>susp</sub> se presentan en el Cuadro siete.

**Cuadro 7. Edad, peso, días de lactación y número de lactancia, expresadas en promedio ( $\pm$  D.E) de las vacas Holstein-Friesian inscritas en este ensayo**

<b>Presentación</b>	<b>Peso*</b>	<b>DEL</b>	<b>Lactancia</b>	<b>Edad</b>	<b>Promedio producción*</b>
<b>enro-C<sub>pd</sub></b>	636 $\pm$ 30.12	186 $\pm$ 115	2 $\pm$ 0.78	4 $\pm$ 0.89	33 $\pm$ 8.24
<b>enro-C<sub>susp</sub></b>	612 $\pm$ 29.24	201 $\pm$ 88	2 $\pm$ 0.89	3.7 $\pm$ 0.80	32 $\pm$ 10.51

\*Promedio en litros semanales registrados por programa AfiMilk®, Israel.

Peso: promedio diario en Kg.

DEL: días después del parto en el momento de inclusión al experimento. Edad: expresada en meses.

Todos los animales fueron cateterizados en la vena yugular después de ser asignados al tratamiento correspondiente, fueron tratados a dosis de 300 mg/20ml en el cuarto afectado durante tres días. El seguimiento a las concentraciones séricas del antibiótico se llevó previo a la aplicación del tratamiento y en los tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 24 horas, posterior a la aplicación del primer día de tratamiento y cada doce horas después de las siguientes aplicaciones hasta las 72 horas. Se recuperó suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se identificó y se congeló a -20°C hasta analizar. Muestras de leche 25-30 ml fueron recolectadas de manera aséptica previo a la aplicación de los tratamientos y en los tiempos, 8, 16 y 24 h después de la aplicación del primer tratamiento, muestreos en leche se repitieron cada 8 horas hasta las 88 horas después del primer tratamiento, tiempos coincidentes con los tiempos de ordeño establecidos por el establo.

### 5.8 Ensayo microbiológico

Para la determinación de concentraciones de enrofloxacin en suero sanguíneo y leche posterior a la administración de tratamientos IMM, se utilizó un método microbiológico, que se basa en la difusión en la sustancia activa en medio de agar, inoculado con una cepa sensible de *Escherichia Coli ATCC 10536*, de acuerdo

con lo establecido por Bennett et al. (1996). El contenido de enrofloxacin en fluidos es determinado mediante el diámetro de zonas de inhibición, proporcional a zonas de inhibición de concentraciones del antibiótico conocidas. Los medios se incubaron a 37°C durante 24 horas y el diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento fueron registrados.

#### 5.9 Determinación de residuos por Delvotest® SP- NT

Muestras de leche fueron agitadas durante 10 minutos a 1500 rpm mediante el uso de un agitador (Heidolph, Brinkmann®) previo a los análisis, para la homogenización de la muestra. La presencia de residuos de antibióticos en la leche se evaluó mediante el sistema de pruebas microbiológicas Delvotest® SP- NT (DSM- Especialidades alimenticias) según las directrices del fabricante.

La presencia de residuos antibióticos en leche se evaluó en los animales seleccionados previo y posterior a los tratamientos con ambas presentaciones de enro-C intramamaria. Se realizaron un estándar de diluciones en leche previamente analizada y con resultado negativo a inhibición, con el objetivo de establecer el límite de detección del kit, muestras de leche fueron enriquecidas con enro-C, a concentraciones de 200, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.2083, 0.1562, 0.1045, 0.0781, 0.0522, 0.0261 µg/mL y un control negativo.

El análisis de las muestras de leche se realizó por duplicado. Se añadieron 0.1ml de muestra de leche en cada pocillo individual de ambos mediante el uso de pipetas estériles, posteriormente se incubaron a una temperatura de 64 ° C +/- 2 ° C, durante 3 horas. Controles de la leche positiva a antibiótico y negativa se utilizaron para cada ensayo. La interpretación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Para interpretación visual del color al final del tiempo de incubación las muestras se clasificaron en dos categorías, como se presentan en el Cuadro ocho. Las interpretaciones de color se realizaron por tres diferentes personas y la moda de las muestras fue registrada.

**Cuadro 8. Clasificación de acuerdo con coloración en tubos del kit Delvotest® SP- NT**

Presencia de inhibidor	Color
(-/-)	Amarillo
(+/+)	Azul, Morado.

+: positivo; -: negativo

#### 5.10 Cultivo de células

Células provenientes de un explante de glándula mamaria de bovino donadas por el Dr. Eduardo García (Inst. Investigaciones Biomédicas. UNAM), se utilizarón para el ensayo de citotpxicidad *in vitro*, la cuales fueron cultivadas en botellas adherentes de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Corning® CLS3375) con medio Eagle modificado por Dulbenco (DMEM) (Gibco® D5796) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) 10%, pirubato de sodio 0.1%, HEPES 0.1%, Penicilina/estreptomicina(Sigma-Aldrich®P4333) 0.1%, Insulina 10 mg/mL (Fisher Scientific N°128L) e hidrocortisona 50 µM (Sigma-Aldrich®H6909) a 37 ° C y 5% CO2 hasta lograr una confluencia del 80-90%. Posteriormente las células fueron despegadas con tripsina mediante el protocolo utilizado por Zavizion *et al.* (1996). y sembradas sobre matrices de colágeno (2mg/ mL) en placas de poliestileno (Corning® CLS3313) por 24 horas con medio DMEM sin antibiótico. Las células se sembraron a una concentración de 6 x 10<sup>4</sup> células/pozo.

#### 5.11 Tratamientos y determinación de toxicidad celular por citometría de flujo.

Se realizaron tratamientos con concentraciones de enro-C<sub>pd</sub> de 20.9 µg/ml y 40.0 µg/ml correspondientes a valores máximos y dobles obtenidos de un estudio farmacocinético previo y un grupo sin tratar como control, los tratamientos se aplicaron cada 24 horas durante 3 días semejante al protocolo usado in vivo, bajo dos condiciones de cultivo celular diferentes; medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10% y medio DMEM sin suero fetal bovino.

Las células fueron lavadas con solución buffer fosfato salino (PBS 1X) y el medio fue cambiado, previo a la aplicación de los tratamientos. Después de transcurridas 24 horas a partir de la aplicación del último tratamiento, se realizó un lavado de las células con PBS 1X, posteriormente se adicionó una dilución de 1:200 del fluorocromo Aqua Zombie™ de acuerdo con el protocolo de tinción celular del proveedor (BioLegend®) en un volumen de 20µL en PBS 1X. Se incubó la tinción durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad, posteriormente las células tratadas se re-suspendieron en 200 µL de formaldehído al 2% durante 5 minutos a temperatura ambiente en obscuridad con el objetivo de fijar el fluorocromo. Inmediatamente después se procedió a realizar las lecturas en citómetro de enfoque acústico Attune®. Células procedentes a grupo sin tratamiento se usaron como control y como blanco para calibración del equipo.

#### 5.12 Análisis estadístico

La contribución relativa de cada factor para la probabilidad de cura clínica y cura bacteriológica se determinó a través de regresión logística. Cura clínica y cura bacteriológica se consideraron como variables dependientes, mientras que tratamientos, número de parto (1, 2, 3 ó más), días después del parto y número de infecciones intramamarias en la lactancia actual se consideraron como variables independientes. Las variables cura clínica y cura bacteriológica se analizaron por medio de regresión logística, previo al análisis se evaluaron de acuerdo con el método Hosmer y Lemeshow (2000). Las covariables que no demostraron efecto, ( $P > 0.05$ ) para el análisis, fueron eliminadas de los modelos finales. Diferencias estadísticas  $P < 0.05$  se consideraron significativas para la mayoría de las variables, exceptuando el análisis farmacocinético donde se estableció una  $P < 0.10$ .

El modelo usado para evaluar la probabilidad de cura clínica fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + NL_j + E_{ij}$$

Donde  $Y_{ij}$  es una observación de la variable respuesta,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i = 1, 2, 3$  y  $4$ ),  $NL_j$  es el número de partos ( $1, 2$  y  $>3$ ) y  $E_{ij}$  es el error aleatorio. Para la inclusión del covariable número de lactancia los animales se agruparon como 1, 2 y 3 o más lactancias.

Para la evaluación de probabilidad de cura bacteriológica se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + DL2_j + E_{ij}$$

Donde  $Y_{ij}$  es una observación de la variable respuesta,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i = 1, 2, 3$  y  $4$ ),  $DL_j$  son días dentro del ciclo de lactancia actual y  $E_{ij}$  es el error aleatorio. Para la inclusión de la covariable: días en leche los datos se agruparon en rangos como menores a 100, de 101 a 200 y mayor a 200 días en leche.

Un segundo modelo se utilizó para evaluar el efecto del grupo bacteriano y la interacción bacteriana con el grupo de tratamiento, para la probabilidad de cura bacteriológica:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + T \times P_{ij} + E_{ijk}$$

Donde  $Y_{ijk}$  es una observación de la variable respuesta,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento ( $i = 1, 2, 3$  y  $4$ ),  $P_j$  es el efecto del patógeno aislado en el tiempo 0,  $T \times P_{ij}$  es el efecto fijo para la interacción entre el grupo de tratamiento y el patógeno insolado y  $E_{ijk}$  es el error aleatorio.

Para el análisis de las variables respuesta CCS y CE, se utilizó un modelo mixto con mediciones repetidas en el tiempo, se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + tiempo_j + T \times tiempo_{ij} + E_{ijkl}$$

Donde  $Y_{ijkl}$  son observaciones individuales para CCS y CE en un grupo de tratamiento particular en un momento particular (0, 7, 14, 21 días),  $\mu$  es la media

general,  $T_i$  es el tratamiento ( $i = 1, 2, 3$  y  $4$ ) y se introdujo en el modelo como un efecto fijo, tiempo $_j$  se introdujo como un efecto aleatorio ( $j = 7, 14$  y  $21$  días después del tratamiento),  $T_i \times \text{tiempo}_{ij}$  es el efecto fijo de la interacción entre el grupo de tratamiento y el tiempo, y  $E_{ijkl}$  es el error aleatorio.

Para el análisis de la variable de retorno a producción se utilizó un modelo lineal generalizado con efecto de factores y sus interacciones. Además de un análisis mediante una prueba de Tukey.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + NL_j + DEL_k + E_{ijkl}$$

Donde  $Y_{ijkl}$  es la diferencia entre los promedios de producción de leche 60 días antes y 60 días posterior al tratamiento,  $\mu$  es la media general,  $T_i$  es el tratamiento ( $i = 1, 2, 3$  y  $4$ ),  $NL_j$  es el número de partos ( $1, 2$  y  $>3$ ),  $DL_j$  son días dentro del ciclo de lactancia actual y  $E_{ij}$  es el error aleatorio. Para la inclusión de la covariable: días en leche los datos se agruparon en rangos como menores a 100, de 101 a 200 y mayor a 200 días en leche.

Para el análisis de la distribución de enrofloxacin en leche y suero se llevó a cabo mediante el análisis de dosis únicas y dosis múltiples de ambas presentaciones IMM enro- $C_{pd}$  y enro- $C_{susp}$ . Las comparaciones estadísticas en los parámetros farmacocinéticos séricos y en leche de enrofloxacin después de la administración de enro-C en vacas con mastitis clínica se determinaron usando una prueba T de dos colas. Con valores o no superiores al 10%. Se consideraron que los valores de probabilidad de  $P < 0.10$  eran significativos de equivalencia.

### 5.13 Variables farmacocinéticas

Los datos para la concentración de enrofloxacin en leche y suero sanguíneo se basaron en curvas de concentración individual versus tiempo y se procesaron mediante software especializado, PkAnalyst®.

Se utilizó el Modelo 5 ( $r = 0,8405$ ) con la fórmula general:

$$\text{Concentración (tiempo)} = (\text{Dosis} \cdot K_{AE} \cdot \text{Tiempo}) e^{-K_{AE} \cdot \text{time}} / \text{Volumen}.$$

Para el análisis de citotoxicidad in vitro se tomaron los supuestos de que los datos se distribuían de forma normal y presentaban homocedasticidad. Por lo tanto, se realizó un análisis de ANOVA de una sola vía complementado por la prueba  $t$  de Student. Diferencias estadísticas  $P < 0.05$  se consideraron significativas. Un segundo modelo de regresión lineal simple se trabajó con el objetivo de observar la correlación entre la muerte celular y la concentración del fármaco. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa software FlowJo v10® y el análisis estadístico se realizó con el paquete de software SAS 9.3 (SAS Institute, 2009).



## VI. RESULTADOS

### 6.1 Eficacia

La proporción de vacas primíparas y multíparas en cada tratamiento se presenta en la Cuadro cinco. Para la variable dependiente cura clínica se encontró que el grupo con tratamiento enro-C<sub>susp</sub> se logró cura clínica en 77 de 81 casos (95.06%); Con el tratamiento enro-C<sub>pd</sub> la proporción clínicamente curada fue del 96.25% (77 de 80 casos); El grupo CF tuvo una tasa de curación clínica del 67.69% (44 de 65 casos) y para el grupo enroP la eficacia clínica fue y 57.57% (38 de 66 casos). El análisis estadístico reveló un efecto significativo para la variable cura clínica debido al tratamiento con enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> en comparación con los grupos CF y enroP ( $P < 0.0001$ ). No se encontraron diferencias estadísticas entre el tratamiento con enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub>. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos CF y enroP ( $P > 0.05$ ). Se observó un efecto debido al número de lactancias sobre cura clínica para los grupos CF y enroP, con menores tasas de curación, cuando los animales incluidos en el estudio tenían un mayor número de lactancias ( $P < 0.05$ ). Este comportamiento no fue significativo para los grupos enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> ( $P > 0.05$ ).

Los hallazgos bacteriológicos de todas las vacas inscritas al momento de inclusión al ensayo se presentan en el Cuadro nueve. Los casos de IIM fueron elegibles para evaluar la cura bacteriológica cuando el microorganismo causante no se aisló de las muestras de leche en tres ocasiones consecutivas los días 7, 14 y 21 después del tratamiento. Los casos de IIM que no fueron elegibles para su inclusión en el cálculo final de la tasa de cura bacteriológica, fueron aquellos en los que el aislamiento bacteriano no fue posible al momento de inclusión en el estudio, es decir, en 118 casos la identificación del patógeno no fue posible. También los casos debidos a *Staphylococcus aureus* ( $n = 27$ ) y *Nocardia spp.* ( $N = 1$ ) no se tomaron en cuenta, para el análisis de cura bacteriológica. En estas condiciones, el grupo enro-C<sub>susp</sub> presentó una cura bacteriológica del 90% (36 de

40 casos elegibles); El grupo enro-C<sub>pd</sub> logró una cura bacteriológica del 95,12% (39 de los 41 casos elegibles); Para las curas bacteriológicas en los grupos CF y enro-R fueron 88,88% y 83,33% (8 de 9 casos elegibles y 10 de 12 casos elegibles, respectivamente). El modelo estadístico elegido para evaluar el efecto de interacción del grupo bacteriano frente al grupo de tratamiento mostró un efecto significativo de la especie de bacteria aislada en el caso de mastitis sobre la probabilidad de curado. Los animales con una infección causada por *Streptococcus uberis* mostraron una probabilidad de cura significativamente menor que los animales con otros patógenos ( $P < 0.0001$ ).

## 6.2 Conteo celular somático y Conductividad eléctrica

Para el análisis de las variables CCS y CE, sólo se consideraron los datos de las vacas curadas clínicamente posterior a la aplicación de los tratamientos. Se tomaron los datos previos a recibir alguno de los tratamientos y en los días siete, 14, 21 después del terminados. Se observó un efecto estadísticamente significativo de la disminución lograda en el tiempo en los valores de CCS y CE en los grupos enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> en comparación con los grupos CF y enroP ( $P < 0.05$ ) en mediciones correspondientes a los días: cero, siete y 14; alcanzando un nivel estable en los grupos anteriores al séptimo día después del tratamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al día 21 entre los tratamientos para ambas variables  $P=0.0742$  y  $P = 0.0621$  para CCS y CE respectivamente. El comportamiento de las variables se muestra en la Figura uno.

**Cuadro 9. Bacterias aisladas de las vacas enroladas en el estudio (número / proporción de cada grupo)**

<i>Bacteria aislada</i>	<i>enro-C<sub>susp</sub></i> <i>n=81</i>	<i>enro-C<sub>pd</sub></i> <i>n=80</i>	<i>CF</i> <i>n=65</i>	<i>enroP</i> <i>n=66</i>
<b>Gram negativas</b>				
<i>Enterobacter sp.</i>	1 (1.23)	2 (2.5)	0	2 (3.03)
<i>Escherichia coli</i>	12 (14.81)	14 (17.5)	13 (20)	9 (13.63)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1 (1.23)	0	0	0
<b>Gram positivas</b>				
<i>Bacillus subtilis</i>	3 (3.70)	2 (2.5)	2 (3.07)	4 (6.06)
<i>Micrococcus sp.</i>	1 (1.23)	0	0	1 (1.51)
<i>Nocardia sp.</i>	1 (1.23)	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5(6.17)	8 (10.0)	7 (10.76)	7 (10.60)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9 (11.11)	9 (11.25)	6 (9.23)	6 (9.09)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	8 (9.87)	7 (8.75)	4 (6.15)	5 (7.57)
<i>Streptococcus uberis</i>	3 (3.70)	4 (5.0)	4 (6.15)	4 (6.06)
Combinada con <i>E. Coli</i>	2 (2.46)	3 (3.75)	3 (4.61)	3 (4.54)
Levaduras	1 (1.23)	2 (2.5)	0	2 (3.03)
Sin desarrollo	34 (41.97)	29 (36.25)	26 (40.00)	23 (34.84)

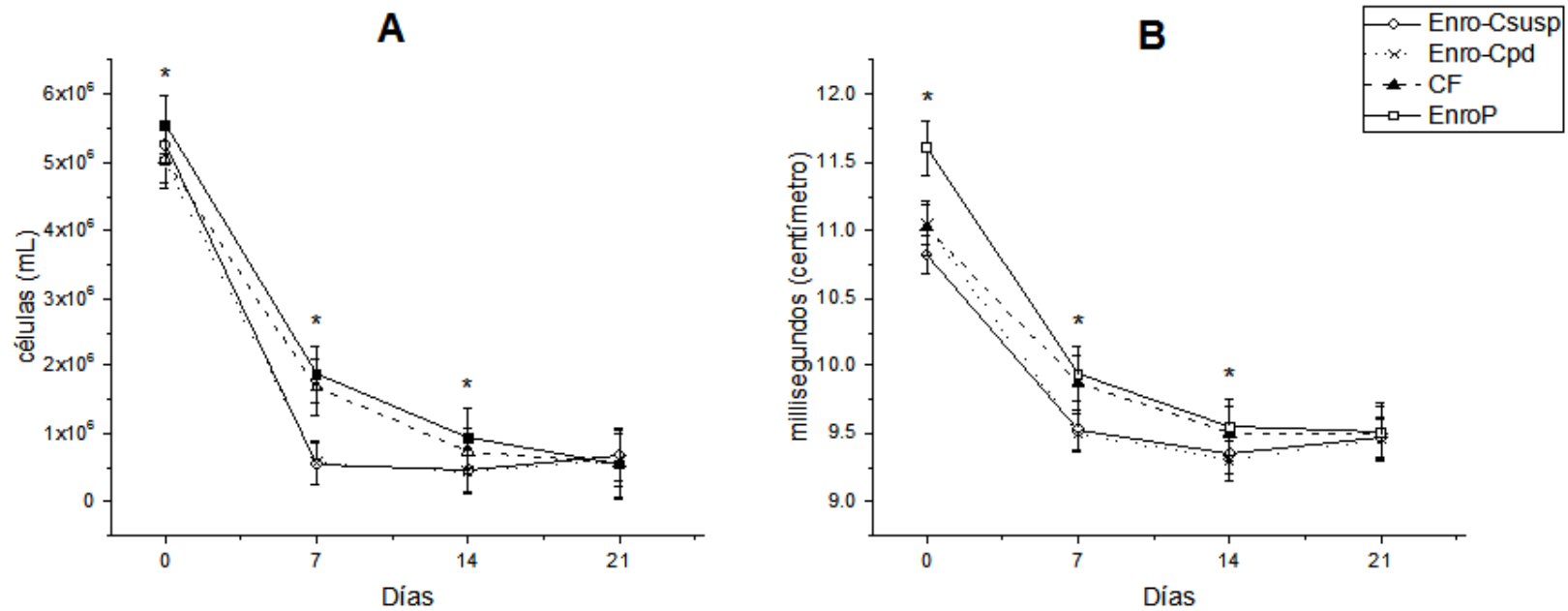


Figura 1. Promedio  $\pm$  1D.E para conductividad eléctrica (A) y el conteo de células somáticas (B) en vacas curadas clínicamente en los días siete, 14 y 21.

Valores estadísticamente menores para la corriente eléctrica o los recuentos de células somáticas para enro-Csusp y enro-Cpd mediante el contador de células De Laval DCC® se destacan con \* ( $P < 0,0001$ ). Día 0: corresponde al momento de inclusión en el estudio. Los días siete, 14 y 21 son medidas posteriores al tratamiento.

### 6.3 Producción

Se encontraron efectos debido a: tratamiento, ( $P=0.0286$ ), número de lactancia ( $P=0.0213$ ), y días en producción ( $P=0.0316$ ), para la variable de retorno a producción. Los animales tratados con cualquiera de las presentaciones de enro-C tenían una pérdida en el promedio de leche 60 días posteriores al diagnóstico y tratamiento de mastitis clínica de 3.3819 y 3.2714 litros para enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> respectivamente en comparación con el promedio de producción 60 días previo al diagnóstico. Diferencias estadísticas se encontraron entre ambos grupos ( $P>0.05$ ). Para los grupos tratados con enroP y CF se encontró un promedio de 6.0498 y 4.8900 litros de pérdida promedio posterior al tratamiento en comparación con el promedio de producción 60 días previo al diagnóstico, diferencias significativas se reportan entre ambos grupos ( $P<0.05$ ).

Los animales que fueron diagnosticados previo a los 100 días en producción y tratados con alguno de los preparados de enro-C tuvieron un incremento en el promedio de producción 60 días posterior al tratamiento de 0.78 litros. Este comportamiento no se observó en los grupos CF y enroP.

Los animales que se encontraban en su primera lactancia tenían una baja en el promedio de producción en leche menos abrupta 1.99 litros en comparación con los animales de 2 y 3 lactancia para todos los tratamientos.

### 6.4 Farmacocinética

El método microbiológico para cuantificación de leche y sangre se validó en cuanto a especificidad, linealidad y precisión. Se estableció el límite de detección de 0.20 $\mu$ g/ml de la prueba microbiológica. La precisión del procedimiento analítico se evaluó a través de la repetibilidad (intra-ensayo) y la precisión intermedia (inter-ensayo). La repetibilidad del método fue evaluada mediante un estándar de enrofloxacin con las mismas concentraciones, el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. La precisión intermedia se evaluó comparando los resultados obtenidos del estándar en ensayos con fechas diferentes.

Concentraciones de 20,0 a 0,522  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de enro-C se prepararon a partir de la solución patrón estándar. Para estudiar la linealidad el estándar se probó en cada ensayo (20 repeticiones). Graficas de concentración se obtuvieron mediante la medición de los diámetros en zonas de inhibición. El método propuesto fue evaluado por su coeficiente de correlación y el valor de intercepción. Se observó una correlación entre los logaritmos de concentración y las zonas de inhibición ( $r^2=0.9932$ ). Figura dos.

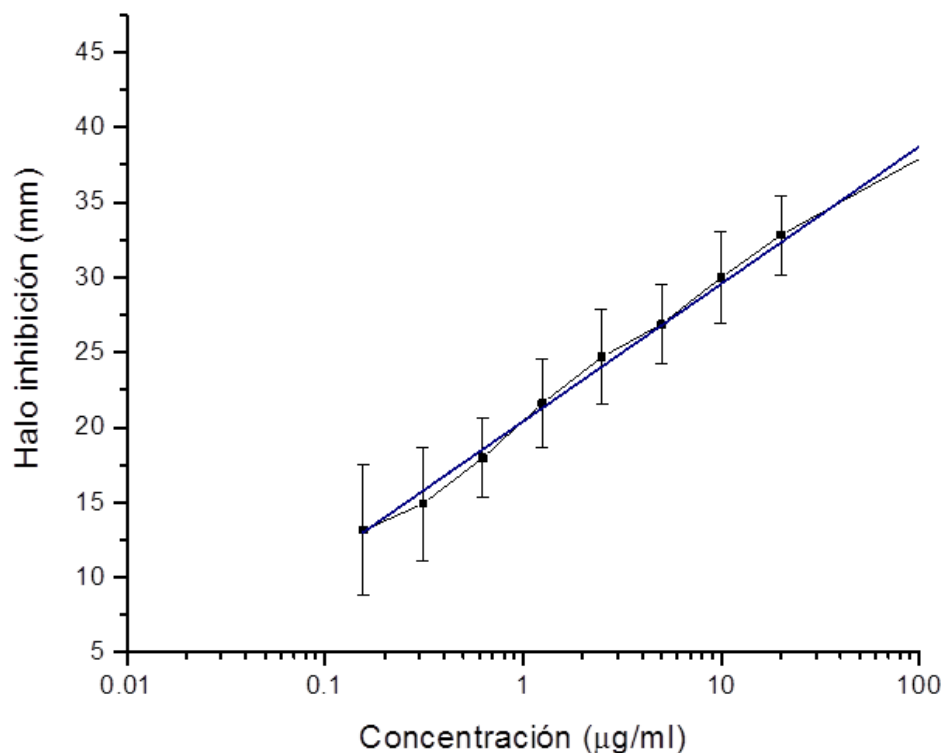


Figura 2. Valor medio  $\pm$  desviación estándar de concentraciones y halo de inhibición, obtenidos en ensayo microbiológico con *Escherichia Coli*

Los valores farmacocinéticos obtenidos para la concentración sérica enrofloxacina de cada grupo se presentan en el cuadro 10. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se encontraron entre las variables CMAX, TMAX, AUC, entre ambas presentaciones, enro-C<sub>pd</sub> y enro-C<sub>susp</sub>. Curvas de concentración plasmática contra tiempo de enrofloxacina para ambas presentaciones de la primera aplicación se muestran en la Figura tres. Valores farmacocinéticos de enrofloxacina en leche se presentan en Cuadro 11 y Figura cuatro, diferencias estadísticamente significativas se encontraron entre las concentraciones de enrofloxacina en leche correspondientes a los tiempos 8 h ( $P=0.0589$ ), 32 h ( $P=0.0157$ ) y 56 h ( $P= 0.0891$ ) post administración de ambas presentaciones.

**Cuadro 10. Valores farmacocinéticos séricos de enrofloxacina clorhidrato-dihidrato de dos diferentes presentaciones intramamarias, enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> en vacas con mastitis clínica, tratados con tres dosis cada 24 horas con 300 mg de enrofloxacina clorhidrato**

Parámetro	enro-C <sub>susp</sub> (preparado farmacéutico)			enro-C <sub>pd</sub> (suspensión)		
	1 dosis	2 dosis	3 dosis	1 dosis	2 dosis	3 dosis
C <sub>MAX</sub> (µg/mL)	0.1847 <sup>a</sup>	0.5213 <sup>a</sup>	0.5292 <sup>a</sup>	1.6564 <sup>b</sup>	2.9875 <sup>b</sup>	0.8683 <sup>b</sup>
T <sub>MAX</sub> (h)	1.6399 <sup>a</sup>	24	48	2.3782 <sup>b</sup>	24	48
AUC <sub>0-24</sub> (µg/mL·h)	0.8231 <sup>a</sup>	7.5920	11.4110	10.7082 <sup>b</sup>	31.3875 <sup>b</sup>	9.8205 <sup>b</sup>
T <sub>1/2β</sub> (h)	1.1367	-	-	1.64843	-	-
MRT (h)	3.2798	-	-	4.75636	-	-
AUC <sub>t</sub> (µg/mL·h <sup>2</sup> )	1.0060 <sup>a</sup>	-	-	8.08500 <sup>b</sup>	-	-

n = 10 vacas por grupo. C<sub>MAX</sub> = concentración sérica máxima; T<sub>MAX</sub> = tiempo en alcanzar la C<sub>MAX</sub>; AUC = área bajo la curva; T<sub>1/2β</sub> = vida media de eliminación; MRT = tiempo medio de residencia; AUC<sub>t</sub> = área bajo la curva trapezoidal. <sup>a, b</sup>: Valores con diferentes letras superíndice difieren significativamente dentro de una fila ( $P < 0.05$ ).

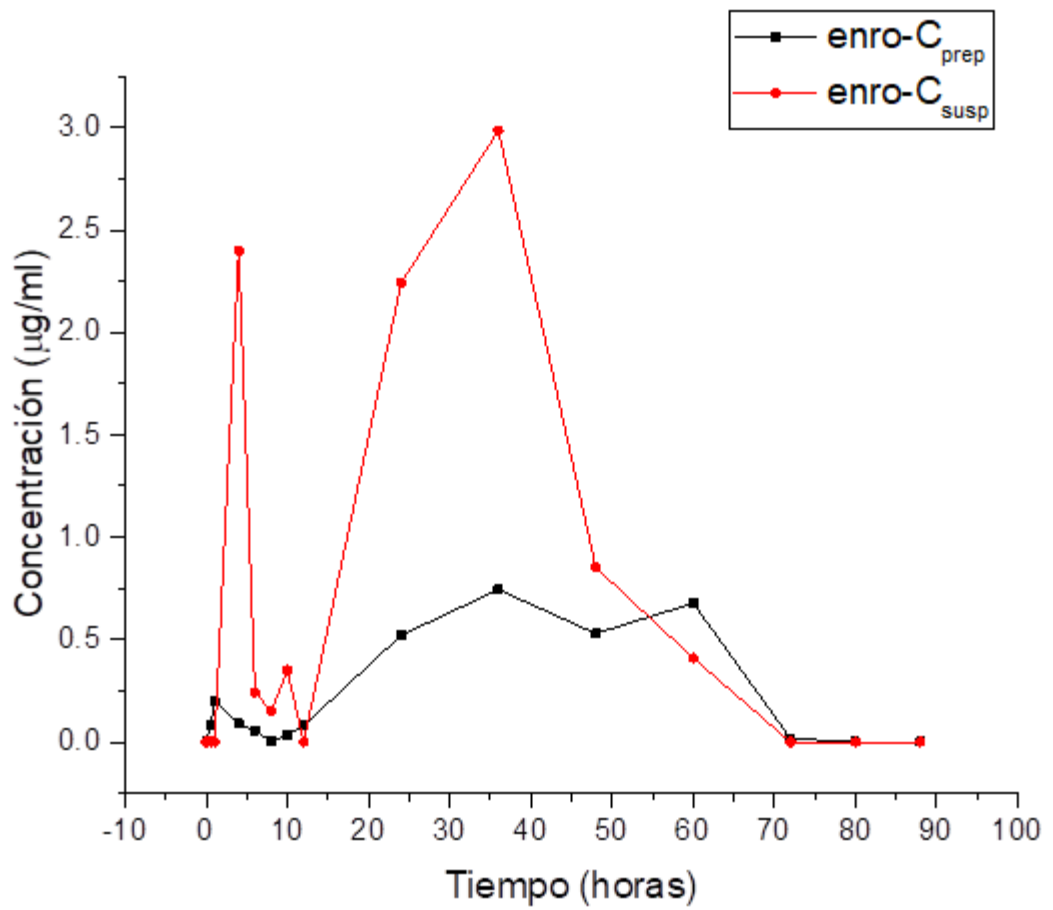


Figura 3. Valores medios de concentraciones séricas de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato, posterior a la administración intramamaria de 3 dosis de 300 mg de enro-Cpd y enro-C susp cada 24 horas en vacas con mastitis clínica



**Cuadro 11. Valor medio  $\pm$  desviación estándar de concentraciones de enrofloxacina clorhidrato-dihidrato logradas en leche de glándulas con mastitis clínica, tratadas con 300mg enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> cada 24 horas, durante 3 días.**

Dosis/ tratamiento	Horas después de primer tratamiento	enro-C <sub>susp</sub>		enro-C <sub>pd</sub>	
		X	$\pm$ 1SD	X	$\pm$ 1SD
1	0	0	0	0	0
	8	2.5038 <sup>a</sup>	2.3329	1.8667 <sup>b</sup>	1.8638
	16	0.0415	0.1203	0	0
	24	0	0	0	0
2	32	2.0385 <sup>a</sup>	1.4519	0.7333 <sup>b</sup>	1.0371
	40	0.2262	0.5431	0	0
	48	0.0177	0.0613	0	0
	56	2.3722 <sup>a</sup>	3.6657	2.1467 <sup>b</sup>	2.4427
3	64	0.1673	0.4863	0	0
	72	0	0	0	0
	80	0.0400	0.1200	0	0
	88	0	0.1560	0	0

<sup>a, b</sup>: Valores con diferentes letras superíndice difieren significativamente dentro de una fila (P <0.10).

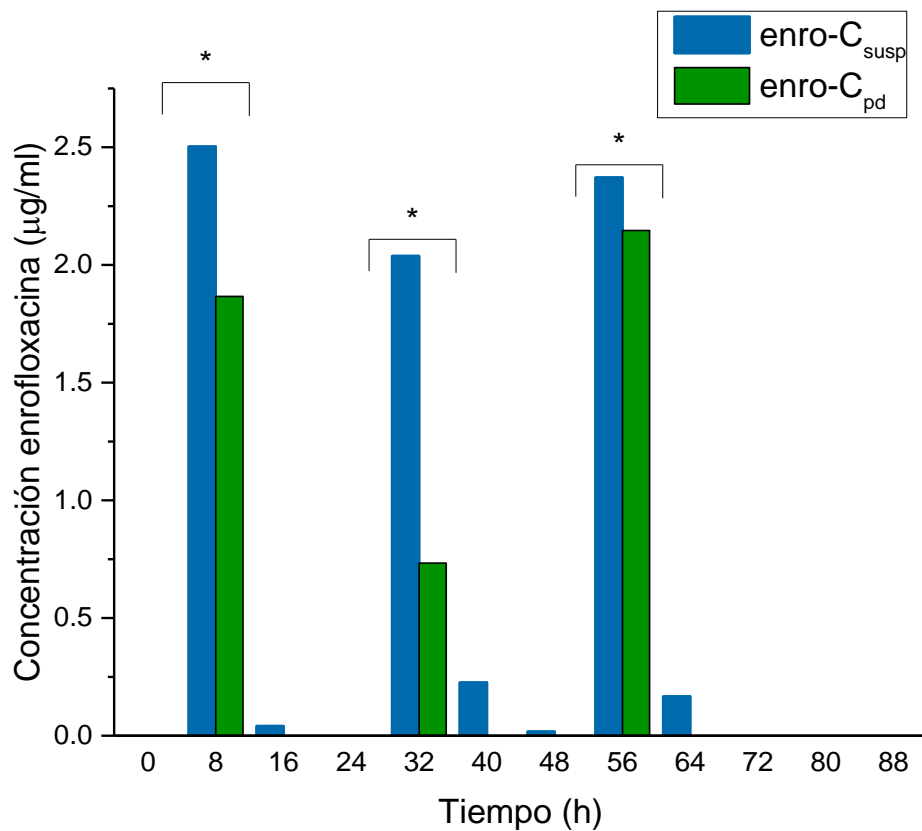


Figura 4. Concentraciones de leche de enrofloxacin posteriores a administraci3n intramamaria de 300 mg/20 ml de enro-C en vacas con mastitis cl3nica en dos presentaciones: enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub>.

\*: Diferencia significativamente dentro de un mismo tiempo (P < 0.10). Los tiempos 0, 24 y 48 corresponden al momento de aplicaci3n de un tratamiento

## 6.5 Residuos

Las muestras de leche correspondientes al tiempo 0 (previo a la aplicación de tratamientos) no presentaron lecturas positivas a inhibición de crecimiento microbiano, por lo que fueron usadas como control negativo. Los tiempos: 56, 64, 72, 80 y 88, correspondientes a 8, 16, 24, 32 y 40 horas post administración del último tratamiento, fueron sometidos a análisis. Estos fueron negativos a inhibición previamente a análisis inhibición microbiológico de *Escherichia Coli ATC 10536*. El Cuadro 12, muestra los resultados del kit Delvotest® SP- NT, para la curva de detección, que se estableció. Se encontró que de las concentraciones utilizadas el kit Delvotest® SP- NT, detecta concentraciones hasta de 0.2038 µg/ ml, por lo que se considera una prueba muy sensible para detección de enro-C.

**Cuadro 12. Concentraciones utilizadas para determinar límites de detección para enro-C de Delvotest® SP- NT en la leche de bovino**

<b>Concentración de enro-C utilizadas (µg / mL) en leche</b>	<b>Resultado (inhibición de crecimiento)</b>
200	+
20	+
10	+
5	+
2.5	+
1.25	+
0.6250	+
0.31225	+
0.2083	+
0.1562	-
0.1045	-
0.0781	-

---

**0.0522**

-

**0.0261**

-

---

Los cuadros 13 y cuadro 14 presentan los resultados del kit Delvotest® SP- NT para las muestras de leche correspondientes a los tiempos establecidos para ambas presentaciones. Residuos antimicrobianos se detectaron en el 26% (13/50) y el 16% (8/50) del total de las muestras de leche tomadas para enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> respectivamente. La distribución de muestras positivas 8 horas posteriores a la última aplicación fue de 76.92% (10/13) y 100%(8/8) del total de muestras positivas para enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> respectivamente. Para 16 horas posteriores a la última aplicación solo se detectaron residuos en 23.07% (3/13) del total de las muestras positivas para enro-C<sub>susp</sub>. Enro-C<sub>pd</sub> no presentó resultados positivos a la prueba de Delvotest® SP-NT, 16 horas posterior a la ultima aplicación. Las muestras correspondientes a 24, 32 y 40 horas posteriores a la última aplicación de los tratamientos presentaron resultados negativos para ambas presentaciones

**Cuadro 13. Resultados obtenidos de muestras de leche mediante el kit Delvotest® SP- NT provenientes de 10 vacas Holstein- Friesian, posterior al tratamiento de mastitis clínica con enrofloxacin deshidratada-HCl /cuarto utilizando enro-C<sub>susp</sub>, durante un periodo de 3 días a intervalos de 24horas**

<b>ID</b>	<b>Horas post tratamiento</b>				
	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>
<b>4604</b>	+	-	-	-	-
<b>8714</b>	+	-	-	-	-
<b>5499</b>	+	-	-	-	-
<b>2839</b>	+	-	-	-	-
<b>7386</b>	+	-	-	-	-
<b>5077</b>	+	-	-	-	-
<b>7673</b>	+	+	-	-	-
<b>4631</b>	+	+	-	-	-
<b>5538</b>	+	+	-	-	-

<b>4201</b>	+	-	-	-	-
-------------	---	---	---	---	---

ID: número de identificación del animal.

+: positivo; -: negativo

**Cuadro 14. Resultados obtenidos de muestras de leche mediante el kit Delvotest® SP- NT, provenientes de 10 vacas Holstein- Friesian, posterior al tratamiento de mastitis clínica con enrofloxacin deshidratada-HCl /cuarto utilizando enro-Cpd, durante un periodo de 3 días a intervalos de 24 horas**

<b>ID</b>	<b>Horas post tratamiento</b>				
	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>
<b>5479</b>	+	-	-	-	-
<b>1657</b>	+	-	-	-	-
<b>4702</b>	+	-	-	-	-
<b>7424</b>	+	-	-	-	-
<b>6066</b>	-	-	-	-	-
<b>8471</b>	+	-	-	-	-
<b>3995</b>	-	-	-	-	-
<b>2791</b>	+	-	-	-	-
<b>5164</b>	+	-	-	-	-
<b>5994</b>	+	-	-	-	-

ID: número de identificación del animal.

+: positivo; -: negativo

## 6.6 Toxicidad celular

El posible efecto citotóxico de diferentes concentraciones del antimicrobiano enrofloxacin (enro-C) se investigó mediante el uso de células provenientes de un explante de glándula mamaria de bovino en periodo de producción. Las concentraciones de enro-C evaluadas en este estudio (0, 20.9 y 42µg/mL) fueron elegidas basándose en los resultados obtenidos de estudios anteriores, donde se encontró que una aplicación intramamaria a dosis de 300 mg/20 ml por cuarto

alcanzo concentraciones máximas de 20.9 µg/ml en leche (resultado máximo presentado en un solo animal). Los datos se distribuyeron de forma normal y presentaban homocedasticidad. Muerte celular post tratamiento con enro-C mostró un aumento dependiente de la dosis sobre la supervivencia celular, sin embargo, los valores finales no fueron estadísticamente significativos Cuadro 15; Con una P= 0.4969 para los tratamientos con medio sin suero fetal bovino y P= 0.0684 para los tratamientos en condiciones con suero fetal bovino. Figura cinco.

La correlación lineal entre la concentración del fármaco y la muerte celular resultó en una correlación positiva, aunque débil entre la concentración de enro-C y el incremento en la muerte de células de glándula mamaria. ( $r^2 = 0.4599$ ,  $P = 0.0447$ ).

**Cuadro 15. Media y desviación estándar de células de glándula mamaria positivas a tinción Aqua Zombie™, obtenidas posteriormente al tratamiento con diferentes concentraciones de enro-C**

Concentraciones enro-c (µg/mL)	<i>Suplementado con SFB*</i>		<i>Sin SFB</i>	
	Medias	Desviación estándar	Medias	Desviación estándar
0	11269.8898	6883.79528	1007.77383	379.447153
20.9	14614.0538	12868.925	934.94245	673.87796
42	23723.6892	2248.38448	1663.78421	1001.30461

\*SFB: Suero Fetal Bovino 10%.

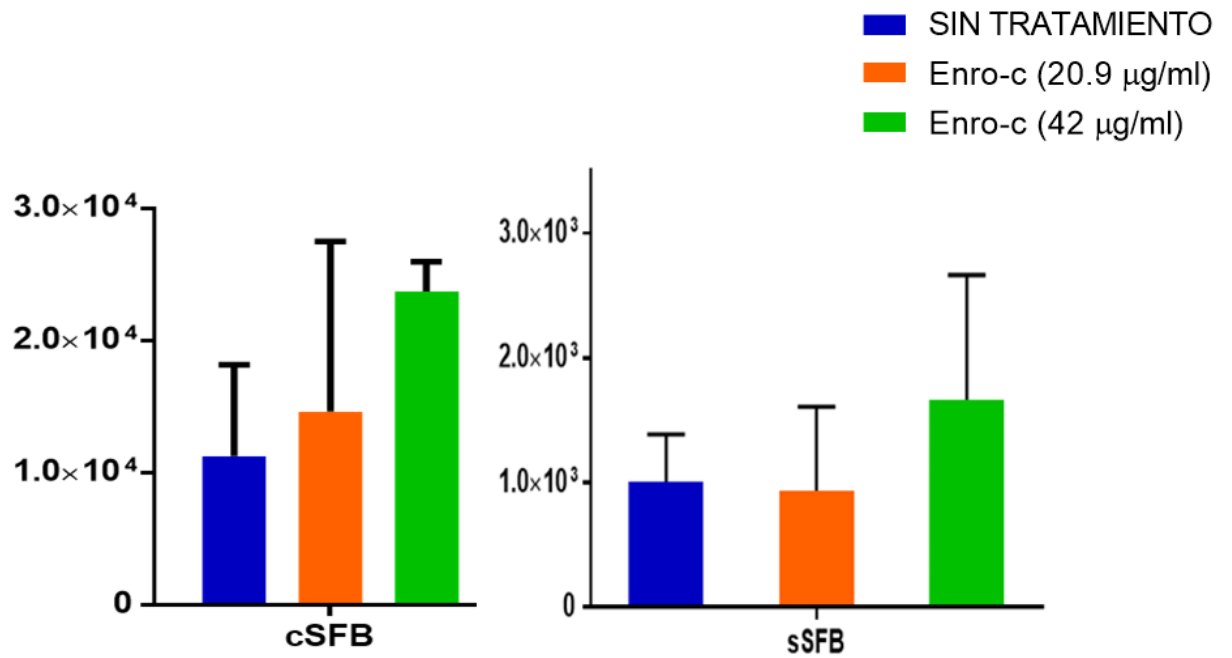


Figura 5. Número total de células muertas (positivas a la tinción con Aqua Zombie™, obtenidas posterior al tratamiento con diferentes concentraciones de enro-C

## 6 DISCUSIÓN

La eficacia de un fármaco antibacteriano en el tratamiento de mastitis esta medida por la habilidad del mismo para lograr eficacia clínica y bacteriológica en el tratamiento de IIM, está es determinada por una amplia gama de factores, relacionados a la vaca (edad, la etapa de lactancia, CCS alto antes del tratamiento, múltiples infecciones), el patógeno (especies causales y la presencia de resistencia antimicrobiana) y el tratamiento (concentraciones alcanzadas en sitio de infección, duración del tratamiento y la vía de administración (Pinzón-Sánchez y Ruegg, 2007; McDougall *et al.*, 2014). Para que un fármaco sea eficaz, la concentración terapéutica debe obtenerse en el sitio de infección (biofase), por eso es que la vía IMM ha sido la vía predilecta para el tratamiento de IIM, debido a que mediante esta se logran concentraciones mayores del fármaco en glándula mamaria en comparación con las concentraciones logradas mediante las vías parenterales. El uso de agentes antibacterianos sigue siendo el principal método para tratar el IIM en vacas (Pol y Ruegg, 2007a; Pol y Ruegg, 2007b), y fármacos de las familias de los beta-lactámicos y macrólidos han sido los preferidos para esta problemática durante varios años, sin embargo la eficacia en los tratamientos ha decrecido con el tiempo y la generación de patógenos resistentes a estas familias ha incrementado en los últimos años, por lo que la evaluación de nuevas opciones antibacterianas para tratar el IIM parece inevitable. Las fluoroquinolonas son una familia de antibacterianos consideradas entre los fármacos más eficaces para el tratamiento de infecciones bacterianas. El uso de fluoroquinolonas para el tratamiento de mastitis bovina ha sido evaluado en los últimos años (Kaartinen *et al.*, 1995, Hoeben *et al.*, 2000, Rantala *et al.*, 2002, Poutrel *et al.*, 2008; Attil *et al.*, 2016), pero sus resultados no pueden considerarse concluyentes, sin embargo, existe una clara ventaja de esta familia de antibacterianos sobre las demás, su capacidad para exhibir una acción bactericida contra la mayoría de los patógenos causales IIM a bajas concentraciones. Poutrel *et al.*, (2008)



evaluaron la eficacia potencial de la danofloxacin sistémica en el tratamiento de casos agudos de mastitis causados por *Escherichia coli*, con una dosis de 6 mg / kg IV. Se encontró que, aunque la curación bacteriológica era similar entre los grupos tratados y no tratados, el depuramiento inicial de las bacterias causantes de los cuartos infectados fue más rápido en las vacas tratadas con danofloxacin y la pérdida de producción de leche y la magnitud de la inflamación de la ubre fue menor en comparación con el grupo control. La enrofloxacin es un antibacteriano de la familia de las fluoroquinolonas ampliamente utilizado en América Latina y la Unión Europea (EU) para el tratamiento de infecciones bacterianas (Page y Gautier, 2012). Es clasificada como un fármaco concentración dependiente, por lo que se recomienda obtener valores concentración máxima (Cmax) 10-12 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el patógeno específico (Cmax > 10-12 CMI) y un área bajo la curva (AUC / CMI  $\geq$  125). Con anterioridad se ha estudiado su capacidad para difundirse en el tejido glandular mamario y la leche y se ha llegado a la conclusión de que el fármaco podría alcanzar concentraciones terapéuticas a este nivel después de su administración parenteral (Kaartinen *et al.*, 1995). Cuando es administrada parenteralmente a una dosis de 5 mg / kg, este resultó en la eliminación rápida de bacterias y una disminución significativa en la pérdida de leche a las 10 y 30 horas posteriores al desafío con *Escherichia coli*, (Hoeben *et al.*, 2000). Igualmente, otros autores han reportado una buena eficacia clínica para tratar el IIM causado por *Escherichia coli* (Rantala *et al.*, 2002; Poutrel *et al.*, 2008). Además, el tratamiento del IIM causado por *Staphylococcus aureus* en ovejas, utilizando enrofloxacin parenteral, se reportó como exitoso (Attil *et al.*, 2016). Por el contrario, Suojala *et al.*, (2010a; 2013b) informó que no hubo diferencias en la curación clínica o bacteriológica del IIM causada por *Escherichia coli* al comparar vacas tratadas con enrofloxacin sistémica (5 mg / kg dos veces con un intervalo de 24 h) y vacas tratadas sólo con ketoprofeno IM a una dosis de 3 mg / kg). La literatura a cerca de enrofloxacin administrada por vía intramamaria para el tratamiento de la mastitis clínica es rara. Esto puede

deberse, entre otros factores, al hecho de que la baja solubilidad en agua de la enrofloxacin requiere valores de pH extremos para disolver el fármaco, a menudo a niveles no fisiológicos (es decir, 10.4), y esto se logra usualmente con KOH (Sumano y Ocampo, 1995). Sin embargo, utilizando una preparación farmacéutica de enrofloxacin, con vehículos no revelados Korudjiski *et al.*, (2009) informaron una alta eficacia de la enrofloxacin para el tratamiento del IIM, comparable a las preparaciones comerciales de ceftiofur y amoxicilina. Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen preparaciones comerciales de enrofloxacin para la administración intramamaria en América y la mayor parte del mundo. Con el objetivo de evitar las desventajas presentadas por la aplicación de un tratamiento antibacteriano por vía parenteral para el tratamiento, la oportunidad de una mayor eficacia en el tratamiento de la mastitis bovina y evaluar el uso de enrofloxacin por vía intramamaria se evaluó el uso de un polimorfo de enrofloxacinna (enro-C). El cual había sido evaluado con anterioridad por Martínez *et al.*, (2016). Ellos administraron una dosis de 300 mg / cuarto en casos de IIM por *Staphylococcus aureus* crónico, coagulasa negativos en vacas Holstein / Zebu con una edad (siete a ocho años), baja producción de leche (6-8 L / día), y en un ambiente tropical húmedo. Se informó de la falta de efectos adversos de este tratamiento y la alta eficacia en lo que respecta a la cura bacteriana se refiere después de 8 días consecutivos de tratamiento con el medicamento. A diferencia de este último ensayo, el objetivo de nuestro estudio fue tratar el IIM clínico no grave en Holstein con alta producción de leche ( $31 \pm 6,8$  L / día) mediante la aplicación IMM de enro-C, utilizando como patrón oro de comparación la administración intramamaria de ceftiofur HCl y como comparación del mismo fármaco antibacteriano, la administración parenteral de la enrofloxacin comercialmente disponible. Diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron sobre la variable de cura clínica a favor de tratamientos con enro-C en comparación con tratamientos con ceftiofur HCl o enrofloxacin parenteral ( $P < 0,05$ ). La eficacia para cura clínica obtenida con ceftiofur en este estudio es similar a los resultados

reportados anteriormente, es decir, 64-65% (Schukken *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2016) y en estos estudios también se usa ceftiofur como estándar de oro para comparar eficacia del uso de tratamientos intramamarios para casos de mastitis clínica. Sin embargo, la cura clínica de IIM tratada con administración parenteral de enrofloxacin (5 mg / kg) se ha reportado con anterioridad como baja (8-21%) registrada el tercer día después del tratamiento (Suojala *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2015). Cumpliendo con esto, encontraron que la administración de SC o IM de enrofloxacin no podría resultar en mayores tasas de curación clínica de 8-20%, respectivamente.

El conteo de células somáticas y la conductividad eléctrica no son criterios para la curación clínica o bacteriológica en sí mismos. Sin embargo, se han propuesto con anterioridad como herramientas válidas para la identificación de procesos inflamatorios y se correlacionan negativamente con el rendimiento de la producción láctea y la calidad de la leche. En el presente estudio se identificó la disminución de CCS para todos los tratamientos, pero fue estadísticamente más pronunciada y más rápida para ambos grupos tratados con enro-C ( $P < 0.05$ ), alcanzando niveles estables en el día siete post-tratamiento. Es tentador vincular estas tendencias con las mayores tasas de curación clínica y bacteriológica obtenidas con enro-C. Otros estudios también han encontrado que las vacas tratadas con enrofloxacin parenteral tuvieron CCS significativamente más bajo en las primeras muestras obtenidas después del tratamiento del IIM con una tendencia hacia un CCS inferior un mes después de la curación clínica (Persson *et al.*, 2015; Martínez-Cortés *et al.*, 2016). Sin embargo, como estas variables pueden verse afectadas por otros factores, como los días de producción y la edad, sólo pueden ser válidos como medidas confirmatorias de curación clínica y calidad de la leche. Es importante destacar que los pocos animales que no fueron curados recibieron otro tratamiento inmediatamente, pero con un fármaco antibacteriano diferente. Por lo tanto, los animales que no alcanzaron la curación

clínica habrían tenido un efecto de confusión sobre las variables evaluadas durante el período de seguimiento.

Para la variable cura bacteriológica, la falta de significancia estadística entre los grupos se atribuye de manera presuntiva a un número reducido de muestras con aislamiento del patógeno claramente caracterizado. Este evento no es exclusivo de este ensayo ya que muchos otros estudios revelan que esta situación es una tendencia (Lago *et al.*, 2011; Pinzón-Sanchez y Ruegg, 2011; Vasquez *et al.*, 2016). Por lo tanto, aunque no se encontraron diferencias estadísticas sobre la probabilidad de curación bacteriológica entre tratamientos ( $P > 0.05$ ) se puede distinguir una tendencia clara en favor de ambos grupos tratados con enro-C. Además, las tasas de curación bacteriológica obtenidas para ambos grupos tratados con enro-C administrado intramamaria-mente son superiores a los datos previamente informados para la enrofloxacin parenteral (Suojala *et al.*, 2010). Aunado con la anterior las tasas de éxito 90 % y 95.12 % para enro-C<sub>susp</sub> y enro-C<sub>pd</sub> respectivamente en cura bacteriológica con el tratamiento enrofloxacin recristalizada clorhidrato dihidrato o se compara bastante favorablemente con otros compuestos intramamarios, los cuales no superan 80% (Royster y Wagner, 2015). El único estudio previo disponible utilizando enro-C a través de la vía intramamaria tuvo una tasa de éxito bacteriológico del 75% (Martínez-Cortes *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados no son comparables, ya que este último estudio se llevó a cabo en ganado Holstein / Zebu de doble propósito afectado por *Staphylococcus aureus* coagulasa negativo, con promedios de edad mayores y en condiciones tropicales húmedas. La tasa de cura bacteriológica de las vacas tratadas con ceftiofur HCl obtenidas en este estudio (88,88%), es mayor que la obtenida con los resultados previamente reportados (73%) (Schukken *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2016). Esto puede explicarse por el hecho de que IIM debido a *Staphylococcus aureus* no fueron consideradas. En este ensayo se decidió eliminar los casos causados por *Staphylococcus aureus*, dada la marcada resistencia a los antibacterianos de este patógeno en esta

lechería, el esquema de tratamiento sería diferente del propuesto. Por ejemplo, el ceftiofur intramamario se indica tres días consecutivos para la mastitis no grave y está indicado durante 8 días (Oliver *et al.*, 2004) cuando se intenta tratar un caso de mastitis por *Staphylococcus aureus* resistente. De hecho, la Asociación Americana de Bovinos recomienda no tratar estos casos porque los porcentajes de eficacia en el tratamiento de este patógeno en la literatura son muy bajos y el riesgo de contagio horizontal es alto (Oliver *et al.*, 2004; Pyörälä, S. y Taponen *et al.*, 2009; Swinkels *et al.*, 2013; Royster y Wagner 2015). Auando a lo anterior la granja lechera donde se llevó a cabo este ensayo había establecido un programa para eliminar vacas con diagnóstico de IIM por *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, un seguimiento no habría sido posible.

Como sugiere Steeneveld *et al.*, (2011) un factor adicional debe tener en cuenta al evaluar el éxito del tratamiento de un medicamento, es decir, el tratamiento secundario necesario en casos que no responden, la correspondiente leche desechada y el efecto de la patogenia sobre la producción. Aunado a lo anterior se reportado con anterioridad que los animales que presentan mastitis experimentan una caída inmediata en el promedio de producción al momento del diagnóstico y un rendimiento suprimido 60 días después de haber obtenido cura clínica (Barlett *et al.*, 1991; Hagnestam *et al.*, 2007). Poutrel *et al.* (2008) reporta que posterior al tratamiento de mastitis clínica por *Escherichia Coli* con danofloxacina, se observó una caída dramática en la producción posterior a la infección y el retorno completo a los valores previos al desafío no ocurrió dentro del período de observación, sin embargo, los animales tratados con danofloxacina presentaron un efecto sobre mayores rendimientos de leche posterior al tratamiento de mastitis. Rantala *et al.* (2002) encontraron una diferencia significativa post desafío a *Escherichia Coli* sobre la producción de leche, que se mantuvo a un nivel más alto en las vacas tratadas con enrofloxacina vía parenteral. En el presenté estudio no se observó un retorno completo a los valores de producción previos a la infección, en acuerdo a lo

reportado por Poutrel *et al.*, (2008). Sin embargo caídas menos drámaticas en el promedio de producción 60 días posteriores a obtener cura clínica en comparación con la producción 60 días antes del caso de mastitis, se observaron en los grupos tratados con enro-C siendo estos de 3.3819 y 3.2714 litros, para enro-C<sub>pd</sub> y enro-C<sub>susp</sub>, respectivamente en comparación a los grupos tratados con enroP y CF se encontró un promedio de producción 60 días posteriores al tratamiento de 6.0498 y 4.8900 litros respectivamente ( $P < 0.05$ )

En el presente, los valores farmacocinéticos obtenidos para el tratamiento con el preparado farmacéutico (enro-C<sub>susp</sub>) y la suspensión (enro-C<sub>pd</sub>) presentaron diferencias significativas entre las variables analizadas. Los parámetros farmacocinéticos para la enrofloxacin en suero en vacas lecheras después de la administración de una dosis intramamaria (300 mg/ 20 ml) del preparado farmacéutico ( $C_{max}$ , 0.1867  $\mu\text{g/ml}$ ,  $T_{max}$ , 1.63 h y AUC 0.8231  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ ) fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) menores que los parámetros correspondientes obtenidos con la sal en suspensión líquida ( $C_{max}$ , 1.6564  $\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max}$ , 2.37 y AUC 10.7082  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ ). Sin embargo, el comportamiento en la leche fue inverso alcanzando mayores concentraciones en la leche del preparado ( $C_{max}$ , 2.5038  $\mu\text{g/mL}$ ) en la comparación de la sal en suspensión líquida en la primera dosis ( $C_{max}$ , 1.8667  $\mu\text{g/mL}$ ). Las concentraciones máximas encontradas en leche no son significativamente mayores a las reportadas de 2 a 2.5  $\mu\text{g/mL}$  en leche, después de la administración vía IM a dosis de 5 mg/kg (Sumano *et al.*, 2002), sin embargo difieren con las reportadas con anterioridad por Martínez-Cortes *et al.* (2016), donde obtuvieron concentraciones máximas de enro-C de 19.8  $\mu\text{g/mL}$ , posterior a la aplicación intramamaria de enro-C a dosis de 300 mg/ml por cuarto en vacas F1 50% Holstein – 50% Cebu. Gehring y Smith (2006) refieren que características propias de la preparación farmacéutica puede modificar la distribución de un fármaco en glándula mamaria, entre ellos uno de los factores que mencionan es el tipo de excipiente utilizado para la presentación, Bhattarai *et al.* (2011), demostraron que el uso de distintos polímeros hidrófilos usados

frecuentemente para presentaciones de uso intramamario y dispersos en un sistema miscible en agua, se someten a un proceso de gelificación in situ cuando se introduce en glándula mamaria. Por lo que este fenómeno de gelificación debido al intercambio de disolvente/ agua, lo cual puede modificar la distribución y liberación del fármaco. Por lo que se cree que la modificación en la distribución de ambos preparados es debido al uso de polímeros hidrófilos en la presentación farmacéutica. Las concentraciones de enrofloxacin en leche y suero alcanzadas con la presentación enro-C suspensión líquida, permiten proponer que la administración intramamaria de este fármaco, una vez al día a una dosis de 300 mg/ 20 ml parece ser suficiente para el tratamiento de diferentes patógenos asociados con la mastitis bovina. Ensayos anteriores de no irritación en glándula mamaria se basaban en observaciones directas de cambio en secreción o calor de la glándula tras aplicación del fármaco. La investigación de la interacción y los efectos de un antimicrobiano sobre células de glándula mamaria bovina in vitro se investigó por primera vez, sin embargo, los protocolos se basaron en estudios previos, la muerte celular post tratamiento con enro-C mostró un aumento dependiente de la dosis sobre la supervivencia celular, sin embargo, los valores finales no fueron estadísticamente significativos. Aunado a lo anterior, existen numerosos factores que modifican la duración de residuos posterior al uso de un tratamiento con antibacteriano, como son: tipo de preparación farmacéutica, dosis utilizada, vía de administración del fármaco, litros en producción, número de ordeños, etcétera (Gruet *et al.*, 2001; Gehring y Smith, 2006). Aunque se deben seguir ciertas referencias para los tiempos de retiro de las diversas preparaciones comerciales que existen, cada preparado debe realizar sus propias pruebas de residualidad ya que los vehículos y la manufactura son distintos y pueden causar diferencias farmacocinéticas en la eliminación de residuos. Estos tiempos, a veces incluyen márgenes de seguridad de 1-2 ordeñas adicionales, después del momento final de eliminación. La prueba de Delvotest® SP-NT está validada para la detección fármacos de uso común en producción de leche: penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefapirina,

ceftiofur, cloxacilina, sulfadiazina, oxitetraciclina, neomicina y eritromicina (Stead *et al.*, 2008). Sin embargo, no se validado como método de detección de fluoroquinolonas, aunque no lo especifica el proveedor ni otros autores mencionan que no se utiliza para la detección de residuos de enrofloxacin (Linage *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2005) Sin embargo, en este ensayo se evaluó y obtuvo que el kit comercial de Delvotest® SP-NT es capaz de detectar hasta 208 ppb (0.2083 µg/mL) para enrofloxacin clorhidrato dihidratp. La importancia de los anterior es debida a que de manera práctica en México se utilizan los kits comerciales de Delvotest® al momento de reincorporar un animal a producción posterior a un tratamiento, pero también es útil ya que permite establecer de forma indirecta tiempos de retiro de la leche proveniente de animales con tratamiento de un estimado de 24 horas para enro-C<sub>susp</sub> y 16 horas para enro-C<sub>pd</sub>. Considerando las observaciones establecidas por (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004), respecto a las características individuales de los animales como rápidos o lentos para eliminar un fármaco, el tiempo de retiro se puede extender hasta por una desviacion estandar. Dado que el límite de detección del kit obtenido en (0.2083 µg/mL) y este valor es el doble del valor de LMR (0.1 µg/mL) y en este ensayo se detectaron muestras negativas desde las 16 horas para enro-C<sub>pd</sub> y 24 horas para enro-C<sub>susp</sub> aproximadamente se postula extender un día más (24 horas) para llegar en teoría al valor LMR y un día más por lo especificado por Toutain y Bousquet-Mélou (2004) equivalente a 3 días de retiro como rango de seguridad para ambas presentaciones. Estos datos son coincidentes con los tiempos de retiro pre establecidos por el producto de referencia los cuales estipulan un periodo de 96 a 72 horas de retiro en leche posterior a la aplicación parenteral del producto que no sea de larga acción. Por lo que el tiempo de retiro se encuentra dentro del rango en tiempo al de los antibióticos aprobados para uso de mastitis clínica y presentaría una ventana de oportunidad para incursionar con un fármaco no utilizado comúnmente en el tratamiento de la mastitis clínica.



Este estudio se realizó de acuerdo con la mayoría de las guías experimentales adoptadas en la literatura formal, ya sea al comparar la administración intramamaria versus parenteral de fármacos (Kalmus *et al.*, 2014) o al evaluar la eficacia de los fármacos administrados a través de la misma ruta (Royster y Wagner, 2015). Por lo tanto, es razonable considerar los datos obtenidos como fiables y reproducibles, en particular porque el análisis de GPower® mostró una potencia de 0,98. El diseño experimental cegado no fue posible debido al aspecto físico de las preparaciones de fármaco y fármaco, que se hicieron fácilmente reconocibles. La exclusión de casos graves de mastitis en este ensayo tenía como objetivo evaluar la eficacia del fármaco en sí, eliminando los efectos de otros fármacos, también recomendados como terapia de soporte para casos graves de mastitis (Erskine *et al.*, 2003). Otros autores que prueban la eficacia de un determinado tratamiento contra la mastitis evitan la inclusión de casos graves de esta enfermedad (Schukken *et al.*, 2011, Schukken *et al.*, 2013, Vázquez *et al.*, 2016). Además, este documento no fue diseñado para evaluar el impacto del uso de enrofloxacin a través de la vía intramamaria. Tal estudio sería necesario para reflexionar sobre los beneficios del uso de este antibacteriano para el tratamiento de la mastitis., por último, aunque los resultados obtenidos en este estudio son alentadores en cuanto a las tasas de curación clínica y bacteriológica, la incorporación de enro-C en el trabajo clínico diario requiere más investigación, es decir, el impacto del uso de enro-C en la tasa y los patrones de resistencia bacteriana en las granjas y en la comunidad. Un efecto que, aunque se sabe que es uno de los más bajos en medicina veterinaria (Frank, 2005; EFSA, 2016), es motivo de preocupación para la comunidad. Además, de establecer los tiempos de retiro en la leche con precisión para los preparados de enro-C.

## 7 CONCLUSIONES

1. El tratamiento intramamario con dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato a dosis de 300 mg /cuarto demostró una mayor eficacia clínica y bacteriológica en el tratamiento de la mastitis clínica bovina en comparación con los tratamientos de uso habitual.
2. El tratamiento intramamario de dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato a dosis de 300 mg / cuarto redujo el número de células somáticas y conductividad eléctrica en leche los días siete y 14 posterior al tratamiento en comparación con los tratamientos de uso habitual.
3. El tratamiento intramamario de dos diferentes presentaciones de enrofloxacin clorhidrato dihidrato a dosis de 300 mg / cuarto presentó un efecto negativo menor sobre el promedio de producción de leche posterior al tratamiento de mastitis clínica en comparación con los tratamientos habituales.
4. La administración intramamaria de enrofloxacin clorhidrato dihidrato a dosis de 300 mg/ cuarto en animales con mastitis clínica, presentó concentraciones terapéuticas de la fluoroquinolona en leche.
5. La citotoxicidad in vitro de enro-C en células epiteliales de glándula mamaria no fue estadísticamente significativa en concentraciones superiores a las máximas logradas con el tratamiento de mastitis clínica mediante el preparado con enro-C intramamario.

## 8 REFERENCIAS

Akers, M.R. & Nickerson, S.C. (2011) Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, 275- 289.

Alva-Murillo, N., Tellez-Perez, A.D., Medina-Estrada, I., Alvarez-Aguilar, C., Ochoa-Zarzosa, A. & Lopez-Meza, J.E. (2014) Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by chole calciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial Pathogenesis*, 77, 24- 30.

Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdez-Alarcón, J.J. & Ochoa-Zarzosa, A. (2006) Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 81, 358–361.

Attili, A.R., Preziuso, S., Ngu Ngwa, V., Cantalamessa, A., Moriconi, M. & Vincenzo, Cuteri. (2016) Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against *Staphylococcus aureus* clinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research*, 136, 72–77.

Aulton, M. E. & Taylor, Kevin (2013) *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 4 edition. Elsevier Health Sciences.

Badawy S.A., Amer, A.M., Kamel, G.M., Eldeib, K.M. & Constable, P.D. (2015) Comparative pharmacokinetics using a microbiological assay and high performance liquid chromatography following intravenous administration of cefquinome in lactating goats with and without experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Small Ruminant Research*, 133, 67–76.

Bar, D., Gröhn, Y.T., Bennett, G., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schulte, H.F., Tauer, L.W., Welcome, F.L. & Schukken, Y.H. (2007) Effect of repeated episodes of

generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 4643–4653.

Bartlett, P.C., Vanwijk, J., Wilson, D.J., Green, C.D., Miller, G.Y., Majewski, G.A. & Heider, L.E. (1991) Temporal patterns of lost milk-production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. *Journal of Dairy Science*, 74, 1561–1572.

Bezman, D., Lemberskiy-Kuzin, L., Katz, G., Merin, U. & Leitner, G. (2015) Influence of intramammary infection of a single gland in dairy cows on the cow's milk quality. *Journal of Dairy Research*, 82, 304- 311.

Bhattarai, S., Bunt, C., Rathbone, M. & Alany, R.G. (2011). Phase behavior rheological and mechanical properties of hydrophilic polymer dispersions. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16, 259- 268.

Bennet, J.B., Brodie, J.L., Benner, E.J. & Kirby, W.M. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical specimens. American Society of Microbiology*, 14, 170 –177.

Bezman, D., Lemberskiy-Kuzin, L., Katz, G., Merin, U. & Leitner, G. (2015) Influence of intramammary infection of a single gland in dairy cows on the cow's milk quality. *Journal of Dairy Research*, 82, 304 – 311.

Bion, C., Henzelin, A.B., Qu, Y., Pizzocri, G., Bolzoni G. and Buffol, E. (2016) Analysis of 27 antibiotic residues in raw cow's milk and milk-based products – validation of Delvotest®. *FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: Vol. 33, No. 1*, 54–59

Blondeau, J.M., Borsos, S., Blondeau, L.D., Blondeau, B.J.J. & Hesje, C.E. (2012) Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary Microbiology*, 160, 85–90.

Blum, S.E., Heller, E.D. & Leitner, G. (2014) Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Journal*, 201, 72–77.

Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E. & Green, M.J. (2007) Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160, 253 –258.

Bradley, A.J. & Green, M.J. (2009) Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *Journal of Dairy Science*, 92, 1941–1953.

Carrascosa, A., De la Peña, A., Gutierrez, L., Sumano, H. (2015) Serum pharmacokinetics and tissue concentrations of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride-dihydrate in hamsters. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39, 661–667.

Caruso, M., Mariotti, A., Zizzadoro, C., Zaghini, A., Ormas, P., Altafini, A. & Belloli, C. (2009) A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicon*, 53, 400 – 408.

Cortinhas, C.S., Tomazi, T., Ferreira-Zoni, M.S., Moro, E. & Veiga-dos-Santos, M. (2016) Randomized clinical trial comparing ceftiofur hydrochloride with a positive control protocol for intramammary treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 5619–5628.

Canut-Blasco A., Aguilar-Alfaro, L., Cobo-Reinoso, J., Giménez-Mestre, M.J., & Rodríguez-Gascón., A. (2015) Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, 48-57

Degen, S., Paduch, J.H., Hoedemaker, M. & Krömke, V. (2015) Review: Factors affecting the probability of bacteriological cure of bovine mastitis. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 43, 222–227.

Deluyker, H.A., Van Oye, S.N. & Boucher, J.F. (2005) Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 604–614.

Du Preez, J.H., 2000. Bovine mastitis therapy and why it fails. *Journal of South African Veterinary Association* 71, 201–208.

EFSA: European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2016) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* 14, (2):4380.

Elizalde, E.F., Signorini, M.L., Canavesio, V.R., Cuatrin, A., Tarabla, H.D. & Calvino, L.F. (2009) Medición de la conductividad eléctrica en leche como método diagnóstico de mastitis subclínica bovina, *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 8.

Erskine, R.J., Wagner, Sarah & DeGraves, F.J. (2003) Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19,109–138

EU. (2010). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2010. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, L15, 1e72.

Faria, J., Valero-Leal, K.G., Dpool, A. García & M. Allara. (2005) Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*. XV 3, 227-234

Fang, G. & Vikerpuur, M. (1995) Potency of antibacterial drugs in milk as analysed by  $\beta$ -glucuronidase-base-fluorometry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, 18, 422-428.

Frank M. Aarestrup. (2005) Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, 271–281.

Freedom of information summary; NADA 141–238: SPECTRAMAST LC sterile suspension (ceftiofur hydrochloride) US Food and Drug Administration (2005). <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm118051.pdf>.

Freedom of information summary; NADA 141–036: PIRSUE sterile solution (pirlimycin hydrochloride). US Food and Drug Administration (2007). Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm116138.pdf>.

Forsbäck, L., Lindmark-Månsson, H., Andrén, A. & Svennersten-Sjaunja, K. (2009) Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. *Animal*, 4, 617–626

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X. & Kaltsatos, V. (2001) Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 245–259.

Guterbock, W.M., Van Eenennaam, A.L., Anderson, R.J., Gardner, I.A., Cullor, J.S. & Holmberg, C.A. (1993) Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. *Journal of Dairy Science*, 76, 3437–3444.

Gutierrez, L., Miranda-Calderon, J.E., Garcia-Gutierrez, P. & Sumano, H. (2014) Physicochemical characterization and pharmacokinetics in broiler chickens of a

new recrystallized enrofloxacin hydrochloride dihydrate. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38, 183–189.

Gehring, R. & Smith, G.W. (2006) An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, 29, 237–241.

Hagnestam, C., Emanuelson, U. & Berglund, B. (2007) Yield Losses Associated with Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2260–2270.

Hebling, J., Bianchi, L., Basso, F.G., Scheffel D.L., Soares, D.G., Carrilho, M.R.O., Pashley, D.H., Tjäderhane, L. & De Souza Costa, C.A. (2015) Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dental materials*, 31, 399 – 405.

Helmbolt, C.F., Jungherr, E.L. & Plaistridge, W.N. (1953) The histopathology of bovine mastitis. *Storrs Agric Exp Stat Bull*, 505 –595.

Hill, A.E., Green A.L., Wagner, B.A. & Dargatz D.A. (2009) Relationship between herd size and annual prevalence of and primary antimicrobial treatments for common diseases on dairy operations in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 88, 264–277.

Hoeben, D., Burvenich, C., Eppard, P.J., Byatt, J.C. & Hard, D.L. (1998) Antibiotics commonly used to treat mastitis and respiratory burst of bovine polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 81, 403 – 410.

Hoeben, D., Montfardini, E., Burvenich, C. & Hamann, J. (2000) Treatment of acute *Escherichia coli* mastitis in cows with enrofloxacin: effect on clinical symptoms and chemiluminescence of circulating neutrophils. *Journal of Dairy Research*, 67, 485–502.



Hogan, J.S., Gonzalez, R.N., Harmon, R.J. *et al.* (1999) Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Revised edition. National Mastitis Council. Madison (WI). 1-222.

Hosmer, D.W. & Lemeshow, S. (2000) Applied logistic regression. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.

Jerjomiceva, N., Seria, H., Völlgera, L., Wang, Y., Zeitouni, N., Naim, H.Y. & Köckritz-Blickwede, M. (2014) Enrofloxacin enhances the formation of neutrophil extracellular traps in bovine Granulocytes, *Journal of Innate Immunity*, 6, 706-712.

Jones, P.J., Marier, E.A., Tranter, R.B., Wu, G., Watson, E. & Teale, C.J (2015) Factors affecting dairy farmers' attitudes towards antimicrobial medicine usage in cattle in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine* 121, 30–40.

Joshy, K.S., Sharma C.P., Kalarikkal N., Sandeep, K., Sabu, T. & Pothan L.A. (2016) Evaluation of in-vitro cytotoxicity and cellular uptake efficiency of zidovudine-loaded solid lipid nanoparticles modified with Aloe Vera in glioma cells, *Materials Science and Engineering C*, 66, 40–50.

Kaartinen, L., Salonen M., Alli L. & Pyörälä S. (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 357–362.

Kalmus, P., Simojoki, H., Orro, T., Taponen, S., Mustonen, K., Holopainen, J. & Pyörälä, S. (2014) Efficacy of 5-day parenteral versus intramammary benzylpenicillin for treatment of clinical mastitis caused by gram-positive bacteria susceptible to penicillin in vitro. *Journal of Dairy Science*, 97,2155–2164.

Karanam, M. & Choudhury, A.R. (2013) Structural landscape of pure enrofloxacin and its novel salts: enhanced solubility for better pharmaceutical applicability. *Crystal Growth and Design*, 13, 1626–1637.

- Kitchen, B.J, Middleton, G., Durward, I.G., Andrews, R.J., Salmon, M.C., 1980. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *Jornañ of Dairy Science*, 63, 978– 983
- Kietzmann, M., Braun, M., Schneider, M. & Pankow, R. (2008) Tissue distribution of marbofloxacin after 'systemic' administration into the isolated perfused bovine udder. *The Veterinary Journal*, 178, 115–118.
- Korudjiski, N., Chaleva, E., Gurgulova, K. & Galabinova, T. (2009) Intramammary products for treatment of subclinical mastitis in cows. *CR Acad Bulg Sci.*, 62, 1039–1046.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke E.H. et al (2009) Classification of cell death: recommendations of the nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3–11.
- Lago, A., Godden, S., Bey, M.R., Ruegg, P.L & Leslie, K. (2011) The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, 94, 4441–4456.
- Le Breton, M.H., Savoy-Perroud, M.C. & Diserens, J.M. (2007) Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Analytica Chimica Acta*, 586, 280–283
- Linage, B., Gonzalo, C., Carriedo, J. A., Asensio, J. A., Blanco, M. A., De La Fuente, F. L. & San Primitivo, F. (2007) Performance of Blue-Yellow screening test for antimicrobial detection in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 5374-5379.
- López Cristina, García, Matilde Sierra, María José Díez, Claudia Pérez, Ana Maria Sahagún & Nérida Fernández. (2015) Systemic and mammary gland disposition of enrofloxacin in healthy sheep following intramammary administration. *BMC Veterinary Research*, 11, 88. <http://doi.org/10.1186/s12917-015-0406-9>

- Mahadik, K.R. & Kuchekar B.S. (2008) Concise Inorganic Pharmaceutical Chemistry (phar.Che-I). (11<sup>o</sup> edition). Pragati Books.
- Martínez-Cortés, I., Gutierrez, L., Tapia, G., Ocampo, L. & Sumano, H. (2016) Serum and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph. *Med Weter*, 72, 686–692.
- Matitashvili, E., Bramley, A.J. & Zavizion, B. (1997) An in vitro approach to ruminant mammary gland biology. *Biotechnology Advance*, 15, 17–41.
- McDougall, S., Hussein, H. & Petrovski, K. (2014) Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand Veterinary Journal*, 62, 68–76.
- McEwen, S.A., Black, W.D. & Meek, A.H. (1991) Antibiotic residue prevention methods, farm management and occurrence of antibiotic residues in milk. *Journal of Dairy Science*. 74, 2128-2137
- Mestorino, N., Marchetti, M.L., Turic, E., Pessoa, J. & Errecalde, J. (2009) Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Analytical Chimica Acta*, 637 ,33–39.
- Miranda-Calderón J.E., Gutierrez L., Flores-Alamo M., García-Gutierrez P. & Sumano H. (2014) Enrofloxacin hydrochloride dihydrate. *Acta Crystallographica Section E*, 70, 0468–0469.
- Molina, M. P., Althaus, R. L., Molina, A., & Fernandez, N. (2003) Antimicrobial agents detection in ewes milk by the microbial inhibitor test brilliant test-BRT AiM®. *International Dairy Journal*, 13, 821-826.
- Montero, A., Althaus, R., Molina, A., Berruga, I., & Molina, M. (2005) Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method (Eclipse 100) for ewe milk. *Small Ruminant Research*, 57, 229-237.

NRC (2001) Nutrient requirements of dairy cattle. 7 th revision. Ed. National Academic Science, Washington, DC.

Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F. & Scholl, D.T. (2008) Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91, 1366-1377.

Oliver, S.P., Almeida R.A., Gillespie, B.E., Headrick S.J., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., Lamar, K.C., Chester, S.T. & Moseley, W.M. (2004) Extended Ceftiofur Therapy for Treatment of Experimentally-Induced *Streptococcus uberis* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 87, 3322–3329.

Oliveira, L., Hulland, C. & Ruegg, P.L. (2013) Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 96, 7538–7549.

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, Juan, J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A. & Baizabal-Aguirre, V.M. (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54, 399 – 409.

Page, S.W. & Gautier, P. (2012) Use of antimicrobials in livestock. *Revue Scientifique et Technique de L'office International des Epizooties*, 31, 145–188

Peaker, M., 1983. Secretion of ions and water. In: Mepham, T.B. (Ed.), *Biochemistry of Lactation*. Elsevier, Amsterdam,. 285–305

Persson, Y., Katholm, J., Landin, H. & Mörk, M.J. (2015) Efficacy of enrofloxacin for the treatment of acute clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Veterinary Record*, Published Online First: 27 February 2015. doi: 10.1136/vr.102667

- Pilla, R., Malvisi, M., M. Snel, G.G., Schawarz, D., Köning, S., Czerny, P. & Piccinini R., (2013) Differeentail cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96, 1653-1660.
- Pinzón-Sánchez, C., Cabrera, V.E. & Ruegg, P.L. (2011) Decisión tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 94,1873–1892.
- Pinzón-Sánchez, C. & Ruegg P.L. (2011) Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 94, 3397–3410.
- Pyörälä, S. (1987) Effects of some vehicles used in intramammary mastitis preparations on inflammation indicators in milk. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 248 – 253.
- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34, 565- 578.
- Pyörälä, S. & Taponen, S. (2009) Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*,134,3-8.
- Pol, M. & Ruegg, P.L. (2007) Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90, 249–261.
- Pol, M. & Ruegg, P.L. (2007) Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 90, 262–273.
- Poutrel, B., Stegemann, M., Roy, O., Pothier, F., Tilt, N. & Payne-Johnson, M. (2008) Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute *Escherichia coli* bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*, 75, 310–318.

- Rantala, M., Kaartinen, L., Välimäki, E., Stryrman, M., Hiekkaranta, M., Niemi, A., Saari, L. & Pyörälä, S. (2002) Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25, 251–258.
- Rajala-Schultz, P.J., Gröhn Y.T., McCulloch, C.E. & Guard, C.L. (1999) Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82, 1213–1220.
- Roberson, J.R., Warnick, L.D. & Moore, G. (2004) Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *Journal of Dairy Science*, 87, 583–592.
- Rodrigues, A.C.O., Caraviello, D.Z. & Ruegg, P.L. (2005) Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk quality teams. *Journal of Dairy Science*, 88, 2660–2671.
- Rosenberg, J.B., Love, B. & Patterson, D.L. (2002) Bacterial cure and somatic cell count response of dairy cows with a positive California mastitis test at calving to therapy with cephapirin sodium. *Veterinary Therapeutics*, 3, 381.
- Rosyter, Erin & Wagner, Sara. (2015) Treatment of Mastitis in Cattle, *Veterinary Clinics. Food Animal Practice*, 31, 17–46.
- Reybroeck, W., Ooghe S., De Brabander H.F., & Daeseleire, E. (2010) Validation of the  $\beta$ -s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. *Food Additives Contaminants Part A*. 27, 1084–1095
- Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sanchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E. & Dohoo, I.R. (2006) Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Preventive Veterinary Medicine*, 77, 96–108.

Sampimon, O., H. W. Barkema, I. Berends, J. Sol, and T. Lam. 2009. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Research*, 76,129-136.

Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Ballou, M.A., Higginbotham, G.E. & Kirk, J.H. (2004) Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 80, 31–45.

Sargeant, J.M., Leslie, K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek, B.J. & Lim, G.H., (2001) Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84, 2018–2024.

Schalm, O.W. & Noorlander, D.O. (1957) Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130, 199–204.

Schällibaum, M. (2001) Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. Annual Meeting Proceeding. National Mastitis Council 40, 38-46.

Schukken, Y.H., Zurakowski, M.J., Rauch, B.J., Gross, B., Tikofsky, L.L. & Welcome, F.L. (2013) Noninferiority trial comparing a first generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 6763–6774.

Schneider, M., Valle, M., Woehrl F. & Boisrame B. (2004) Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *Journal of Dairy Science*, 87, 202–211.

Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F. & Leitner, G. (2014) Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. *Journal of Dairy Research*, 81, 358–363.

- Souza, M.J., Bittencourt, C.F. & Souza Filho, P.S. (2004) Microbiological assay for enrofloxacin injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 271, 287-291
- Stead, S.L., Ashwin, H., Richmond, S.F., Sharman, M., Langeveld, P.C., Barendse, J.P., Stark, J., Keely, B.J. (2008) Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest s SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal* 18, 3 – 11.
- Steenefeld, W., van Werven, T., Barkema, H.W. & Hogeveen, H. (2011) Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *Journal of Dairy Science*, 94, 174–188.
- Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A. & Friis, R.R. (1992) Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 115,49–58.
- Sumano, H. & Ocampo, L. (1995) Compositional analysis surveillance of eleven brands of enrofloxacin including Baytril® for veterinary use. *Journal of Veterinary Medicine*, 42, 669–673.
- Sumano, L.H., Ocampo, C.L. & Gutierrez, O.L. (2001) Non-bioequivalence of 9 trademarks of enrofloxacin and Baytril® in cows. *Dtsch. Tierarzt Wochenschrift*. 108, 311-314
- Sumano, L.H., Ocampo, C.L. & Gutierrez, O.L. (2002) Serum bioequivalence and difusión to milk of 12 trade marks of enrofloxacin and Baytril in cows. Abstract En: XXII World Buiatrics Congress. Hannover, Germany. 18-23.
- Suojala, L., Simojoki, H., Mustonen, K., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (2010) Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 93, 1960–1969.



- Suojala, L., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (2013) Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – an evidence-based approach. *Journal of Dairy Science*, 36, 521–531.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004) Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27, 455–466.
- USDA. 2007b. Dairy 2007: Part V: Changes in dairy cattle health and management practices in the United States, 1996–2007. USDA National Animal Health Monitoring Service. Accessed Sep. 26, 2011.  
[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07\\_dr\\_PartV\\_rev.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_dr_PartV_rev.pdf)
- Vasquez, A.K., Nydam, D.V., Capel, M.B., Ceglowski, B., Rauch, B.J., Thomas, M.J., Tikofsky, L., Watters, R.D., Zuidhof, S. & Zurakowski, M.J. (2016) Randomized noninferiority trial comparing 2 commercial intramammary antibiotics for the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 8267–8281.
- Vijaya R.L., Choudhuri, P.C. & Hamza, P.A. (1998) Sensitivity, specificity and predictive values of various indirect tests in the diagnosis of subclinical mastitis. *Indian Veterinary Journal*, 75, 1004–1005.
- Wright, D.H., Brown, G.H., Peterson, M.L. & Rotschafer, J.C. (2000) Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 669–683.
- Yordanov, G., Skrobanska R. & Evangelatov, A. (2013) Colloidal formulations of etoposide based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 215 – 222.

Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W. & Politis, I. (1996) Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 32, 138–148.

Zhao, Ke, Liu, Hong-Yun, Zhou Miao-Miao & Liu, Jian-Xin. (2010) Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis. *Cell Biology International*, 34, 7 17–72