

# **PAUTAS FARMACOCINÉTICAS/FARMACODINÁMICAS PARA EL USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS EN CABRAS PORTADORAS DE MASTITIS SUBCLÍNICA**

## **Fundamentos de la elección del tema:**

La producción de leche y carne caprinas en Argentina se distribuye en diferentes zonas geográficas, predominando principalmente una u otra según clima y disponibilidad de forraje. Las explotaciones lecheras de tipo industrial se distribuyen en las regiones más húmedas del país, en las que, los forrajes aportan los nutrientes necesarios para la exigencia de dicha especialidad. Mientras que la producción de cabritos (carne), que suele ir acompañada, además, de otros subproductos obtenidos de la leche –excedente- post destete, lo hace en zonas semiáridas y áridas del territorio, las que ofrecen especies forrajeras diferentes cuya composición nutricional es suficiente para tal objetivo.

La naturaleza del propio territorio que impone por sí misma el tipo productivo en diferentes zonas del país (rodeo carnicero/lácteo) también lo hace indirectamente sobre otras características vinculadas a la tecnología empleada por el productor, escala o intensidad de la producción, manejo y tipos de enfermedades más frecuentes. En este último caso, se puede decir que los agentes causales de enfermedades infecciosas siguen la misma distribución.

Sin embargo, la producción láctea como actividad específica y más tecnología dependiente, es relativamente reciente en el país, si se la compara con la tradicional cría de tipo extensiva de cabritos, que se lleva a cabo en casi todo el territorio nacional, en el que predominan las características de clima árido y semiárido.

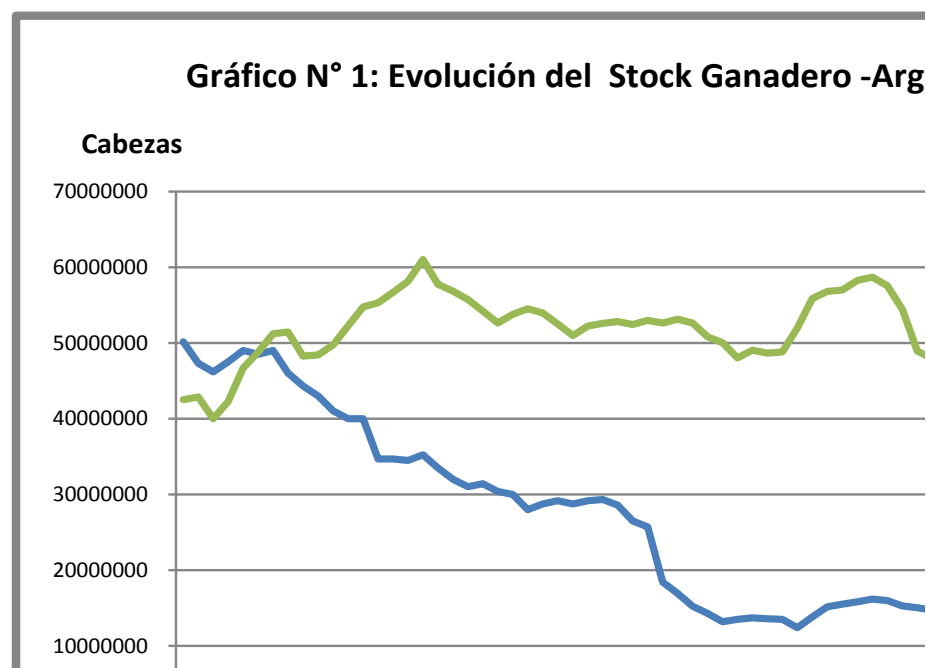
En muchos casos en estas zonas, el excedente de leche es utilizado para la elaboración de quesos y quesillos artesanales, siendo las razas predominantes, la Criolla o cruza con Anglo Nubian y Boer (estas últimas como doble propósito); para el caso de las lecheras se destacan las razas Saanen, Toggenburg y Anglo Nubian.

Otra característica de la actividad caprina vinculada a la cría extensiva y, dadas las particularidades del territorio árido y semiárido, es la de ser de carácter estacional debido a la imposibilidad de dirigir los servicios, llevando a que las pariciones de invierno se caractericen por

grandes pérdidas debidas al frío y falta de nutrientes. Pero pese a ello, la rusticidad de la especie y la adaptación a la presión natural del clima, hace que se haya adaptado y adoptado como medio de vida para la población rural de menores recursos.

Para el caso de la actividad lechera especializada, la situación es diferente, en el sentido que la oferta láctea es más uniforme durante el año para adaptarse a la demanda del mercado y del tipo empresarial, lo que implica inversión en tecnología de manejo y equipamiento específico para lograr altos rendimientos y rentabilidad.

Para situar la actividad en el contexto nacional y en referencia con otras actividades ganaderas como la cría bovina (tanto de carne como de leche) y ovina, la estadística muestra que es la actividad con menor número de cabezas (Gráfico N°1).



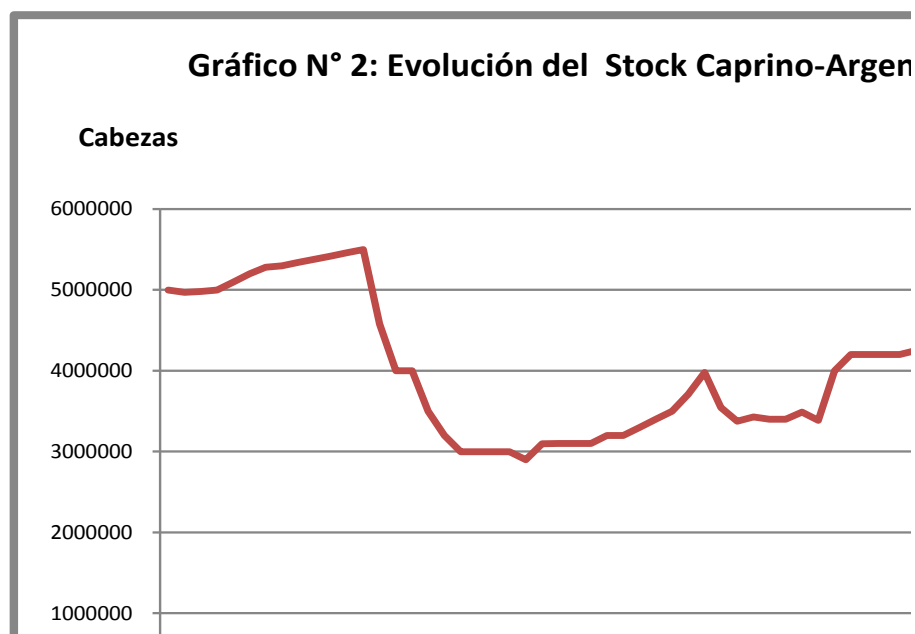
Fuente: FAOSTAT <http://www.fao.org/statistics/es/>

Considerando este parámetro únicamente, se la puede catalogar como una actividad ganadera de menor relevancia en términos económicos, si solamente se tiene como unidad de medida el valor bruto de la producción en valores monetarios.

No obstante ello, desde el punto de vista social y por ser la especie que mejor se ha adaptado a las zonas áridas y semiáridas, es el sustento económico de muchas poblaciones rurales pertenecientes a

estas zonas con la particularidad de ser una especie con gran capacidad para adaptarse a los cambios climáticos, especialmente en zonas donde otros rumiantes como el bovino y ovino no lo pueden hacer (Silau R y Ploszaj 2009).

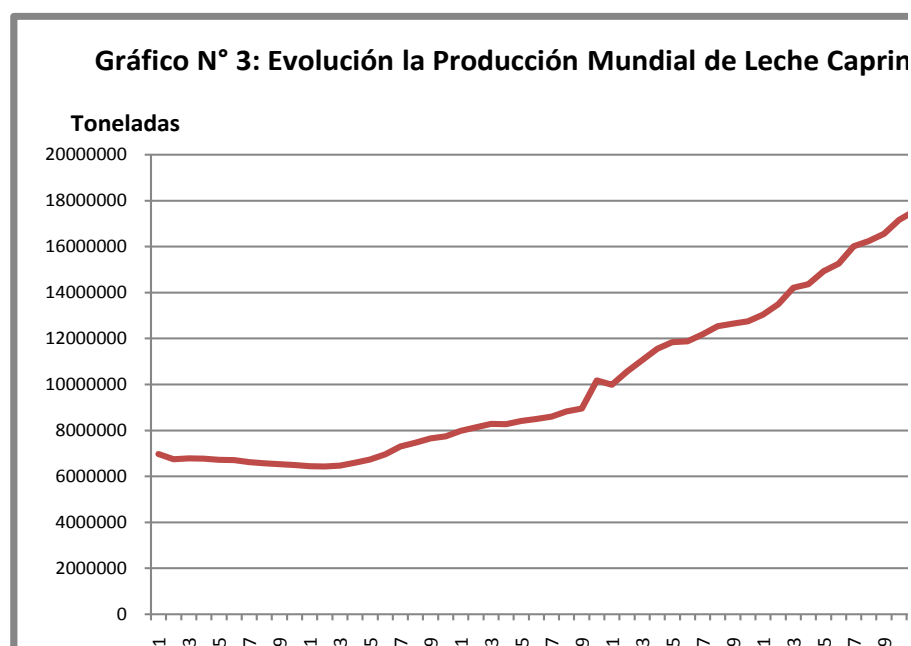
El Gráfico N° 2 muestra que el stock de ganado caprino en la Argentina ha tenido un fuerte crecimiento en el período comprendido entre los años 2000-2013, con un 25 % acumulado, con una tendencia a recuperar el stock existente durante las décadas de los años 60 y 70. Se observa en el gráfico un pico máximo de existencias en el año 1973, una brusca caída hasta el año 1983 y a partir del mismo una tasa de crecimiento constante hasta la actualidad.



Fuente: FAOSTAT <http://www.fao.org/statistics/es/>

Para las razas lecheras, es evidente el crecimiento ininterrumpido de la producción mundial de leche de cabra, como lo muestra el siguiente Gráfico N° 3, expresado en toneladas. Según datos de la fuente, el crecimiento total del período, fue de un 68% desde el año 1993. Es muy probable que en Argentina se de una situación similar, pero no se dispone de datos de la fuente citada. La evolución del crecimiento de la producción se puede explicar en alguna medida por el aumento de la demanda debido a la calidad nutricional de la leche, la cual es muy semejante a la de la leche de vaca, y por ser mejor

tolerada por adultos y lactantes alérgicos a esta última y más fácilmente digestible por el menor tamaño de los glóbulos grasos.



Fuente: FAOSTAT <http://www.fao.org/statistics/es/>

En este sentido, dada la importancia que reviste esta especie para muchos sectores de la sociedad por su adaptabilidad al medio en zonas poco favorables para la crianza eficiente de otros rumiantes mayores; y que la misma es la proveedora de proteína animal y nutrientes para la población rural de zonas áridas y semiáridas del mundo entero, se hace necesario poner todos nuestros esfuerzos en la mejora del manejo sanitario de esta explotación pecuaria. El conocer el comportamiento farmacocinético/farmacodinámico de los antimicrobianos empleados en producción caprina, con miras a maximizar la eficacia conteniendo el avance de la resistencia bacteriana, mediante el empleo de pruebas clínicas controladas en cabras, evitando así la extrapolación de tratamientos diseñados para el ganado bovino y/ovino, serán el punto de partida para implementar un manejo sanitario de excelencia.

La importancia de realizar estudios más específicos, radica en hacer más eficiente el uso de los antimicrobianos, entendiéndose por ello, la reducción de costos de tratamientos al utilizar la formulación específica y las dosis adecuadas de antibacteriano para la especie blanco y por ende la disminución de riesgos de selección y transferencia de resistencia bacteriana ocasionadas por el uso indiscriminado de éstos (de especial interés fundamentalmente para la salud pública).

Por tal motivo en esta tesis Doctoral, se pretende aportar conocimiento sobre el comportamiento farmacocinético/farmacodinámico de los antibióticos más utilizados en el ganado caprino lechero portador de mastitis subclínica ocasionada por *Staphylococcus spp*, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*.

Para el rodeo caprino cuyo propósito productivo es el cabrito y la leche, cuya base genética es la raza criolla con cruza de razas lecheras o de producción mixta, existe escasa información en Argentina acerca de las características de los principales agentes infecciosos responsables de la mastitis caprina y de los factores predisponentes, como también del verdadero impacto económico ocasionado por pérdidas en relación al rodeo lechero (Sticotti *et al* 2013). Es de prever que en los sistemas extensivos, al no disponer de la cantidad de leche suficiente a causa de mastitis (clínicas y subclínicas de carácter crónico), se correlacione con una menor productividad anual, dada la menor disponibilidad de leche para amamantar a los cabritos. Esta menor productividad se expresa posiblemente en un tiempo mayor para lograr el destete, muertes de cabritos en el invierno, muertes de cabras adultas por mastitis clínicas, necesidad de suplementación de la madre, la cual se suma a las pérdidas ocasionadas por menor disponibilidad de pastos en la época invernal. También se deben considerar los menores excedentes para consumo y elaboración de quesos artesanales, repercutiendo así en la economía familiar.

En este caso, se presupone que las pérdidas de leche ocasionadas por mastitis subclínicas, al no ser detectadas por el productor, sea por desconocimiento y/o escasa disponibilidad financiera o técnica profesional, son importantes en cantidad y calidad. Tampoco las asocia con posibles pérdidas de cabritos y consumo familiar por menor disponibilidad de excedentes para la elaboración de quesos y quesillos artesanales.

En los tambos caprinos pertenecientes a cuencas lácteas, donde existe una mayor especificidad en cuanto al uso de razas lecheras o mixtas, cuyo principal comprador es la industria procesadora, la situación es diferente, en alguna medida, dadas las exigencias de higiene y sanidad de la normativa lechera y bromatológica nacional, provincial y municipal, existiendo un conocimiento mayor acerca de la implicancia de las mastitis clínicas y subclínicas en las pérdidas productivas. No obstante ello, las buenas prácticas de manejo durante el ordeño, la higiene y aplicación sistemática de sistemas de control sigue siendo deficiente en términos generales.

Si bien ambas situaciones, implican diferencias en lo cuantitativo y cualitativo en cuanto a la producción láctea, en términos generales la actividad caprina, se ve agravada como ya se ha mencionado por los escasos trabajos de investigación referidos a la problemática y control de las mastitis en la que está implicado el uso de antibacterianos.

### **Mastitis en cabras:**

La mastitis por definición es la inflamación de la glándula mamaria ocasionada por todo tipo de agente que involucre un proceso traumático, infeccioso, tóxico, alérgico, neoplásico, etc., que trae como consecuencias cambios físico-químicos y bacteriológicos de la secreción láctea. En referencia a los cambios físico-químicos de la leche ocasionados por la mastitis, se explican por la ruptura de las células del tejido secretor (epitelio del alveolo mamario) disminuyendo la síntesis de lactosa y grasa; y aumentando la permeabilidad de sustancias de la sangre a la leche (Folly 2009).

El principio de multicausalidad para las enfermedades transmisibles, brinda el marco referencial adecuado para comprender la dinámica de ésta enfermedad, en la que el agente biológico es causa necesaria pero no suficiente para producir la mastitis.

En base a ello se puede decir que los factores desencadenantes o causa suficiente de las mastitis infecciosas, suponiendo la presencia del agente infeccioso, son los vinculados al tipo o práctica de ordeño (manual o mecánico), la higiene del tambo y el tipo de producción en cuanto a si es extensiva o intensiva, la cual se vincula directamente a la tecnología utilizada, sacando como conclusión que las mastitis son más frecuentes en sistemas intensivos que extensivos (Clavijo *et al* 2002).

La expresión empírica de ésta patología es por un lado, la disminución de la producción láctea y por otro, la disminución de la calidad de sus componentes. Los sistemas lecheros que realizan controles periódicos, buscan detectar mastitis subclínicas dado que por un lado son las de mayor frecuencia y por otro, las que ocasionan pérdidas económicas imperceptibles o difíciles de cuantificar.

En cambio las mastitis crónicas son evidentes por mortandad de cabras adultas, y pérdidas lecheras, aunque son de menor frecuencia.

Las mastitis a las que se hace referencia en este estudio, son las de tipo infeccioso dado que son las de mayor prevalencia e implicancia económica en la producción caprina y en salud pública.

### **Agentes infecciosos predominantes:**

Los estafilococos son citados en la literatura científica como los principales agentes etiológicos, tanto de las mastitis clínicas como de las subclínicas. En las clínicas predomina el *Staphylococcus aureus* y en las subclínicas los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN).

En diversos estudios (Corrales 1993,1994; Poutrel 1998) se han informado los siguientes agentes etiológicos de mastitis en cabras: *Staphylococcus* coagulasa negativos y coagulasa positivos (*S caprae*, *S xylosus*, *S epidermidis*, *S chromogenes*, *S.haemolyticus*, *S cohnii*, *S auricularis*, *S aureus* y *S hycus*). Siguen en orden de relevancia las Corinebacterias y por último las bacterias Gram negativas, *Mycoplasma*, *Streptococcus* y Levaduras.

En un estudio realizado sobre 162 cabras del Estado de Puebla (México) se aislaron las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus spp* (19); *Staphylococcus aureus* (7); *Staphylococcus auricularis* (1); *Staphylococcus epidermidis* (6); *Streptococcus* (2); Cocos gram positivos (5); *Micrococcus* (17); *Bacillus* gram negativos (1); *Acinetobacter* (2); *Escherichia coli* (1); *Alcaligenes* (1); Levaduras (1); *Moraxela* (1) (Velázquez 2012).

Según Bergonier (2003) los agentes biológicos más frecuentes causantes de mastitis vinculados a los sistemas productivos de pequeños rumiantes son: *Staphylococcus aureus* en casos clínicos y estafilococos coagulasa negativos (SCN) en mastitis subclínicas.

En las mastitis clínicas y en orden decreciente de prevalencia se han encontrado: *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos (SCN), *Streptococcus sp.* (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*), enterobacterias, *Arcanobacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes*), *Corynebacterium*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus fumigatus* y *Pseudomonas aeruginosa*; y esporádicamente *Burkholderia cepacia* o *Serratia marcescens*.

En Argentina se describe un caso de mastitis clínica presentado en un rodeo caprino lechero en la Provincia de Salta, en el que se aislaron *Corynebacterium spp* y *Streptococcus disgalactiae* de 12 cabras de un total 24 (Micheloud 2013).

Para el caso de las mastitis subclínicas: SCN entre el 25 al 93 % antes de *Staphylococcus aureus* (3 al 37%). Dentro de SCN: *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

*xylosus*, *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus simulans* en orden decreciente en cuanto a la frecuencia. Reviste importancia el caso de *Staphylococcus epidermidis* ya que su presencia está asociada a los mayores recuentos de células somáticas (RCS) (Bergonier 2013).

Clavijo (2002) clasifica a los microorganismos causales en: a) Patógenos ambientales, que se transmiten por contacto directo de la ubre con el suelo contaminado por materia fecal durante el descanso entre ordeñes y b) Patógenos de la ubre, que se transmiten entre ubre enferma y sana por medio de la máquina de ordeño u ordeño manual.

Con respecto a la edad o número de lactaciones, algunos estudios corroboran éste factor como riesgo de infecciones subclínicas a medida que se incrementa el número de lactaciones. El riesgo relativo (RR) encontrado en un estudio según Sánchez A. et. Al. (1999) fue de 1,44, con un intervalo de confianza de -1,02 y 2,04 para la sexta y séptima lactación (Sánchez 1993).

### **Prevalencia:**

Con respecto a la prevalencia, existen diferencias en los trabajos de investigación en cuanto al valor de prevalencia ya sea tomando como unidad de análisis (UA) al animal en sí, o como UA a la majada (rodeo, ható, ó establecimiento). En el primer caso el valor estará referido a la población animal y en el segundo, a la “población” de majadas.

Ambas consideraciones tienen implicancia a nivel epidemiológico, dado que por ej. una alta prevalencia a nivel de población de majadas en un zona tampera, significa mayor probabilidad de contagio y dificultad para el control por parte de la autoridad sanitaria. No así para el caso de una alta prevalencia a nivel de poblacional animal concentrada en pocas majadas.

También es de destacar que el concepto de prevalencia, como atributo o característica poblacional que hace referencia al grado o presencia de una enfermedad en dicha población, encierra un dinamismo propio de parámetros que son afectados por la interacción de diversos factores, como la enfermedad en si, la poblacional afectada y acciones de políticas sanitarias históricas o a implementarse. etc.

Por lo tanto las diferencias de prevalencia de mastitis encontradas, son atribuidas a la variabilidad de los factores predisponentes tanto a nivel local como regional, citando entre ellos a las prácticas de manejo, duración de la lactancia, número de lactancias, época del año, duración del periodo seco, forma



de ordeño, higiene de la máquina de ordeño, concentración de animales, sistemas de controles periódicos implementados, etc.

Según Bazan (2009) en un trabajo realizado en México en diferentes localidades, la prevalencia de mastitis subclínica a nivel poblacional fue del 30,5% coincidiendo con lo reportado por algunos autores, pero no así con otros, por ej: 33,0 % en 14 rebaños de cabras en España, Sánchez (1997); 36,4% en los Estados Unidos, White (1999); 28,7 % en Kenya, Ndegwa (2001); 65,9 % en la India, Bhujbal (2009); y 44,4 % y 87,0 % en Venezuela, Clavijo (2009). También se encontraron diferencias significativas entre sistemas intensivos y semiintensivos, siendo los primeros los que mostraron la mayor prevalencia (Bazan 2009).

Según Bedotti (2002) en un trabajo realizado en el Oeste Pampeano de la República Argentina las mastitis clínicas se presentan en el 60,42 % de las majadas, pero a nivel poblacional en una majada, no supera el 2-3 % y menciona valores semejantes encontrados por Trezeguet (1996) en Santiago del Estero con un 4 %. La incidencia anual de mastitis clínicas es mucho menor que las subclínicas en alrededor del 5 %, Bergonier (2003).

En los rodeos caprinos de carne, las pérdidas atribuidas a mastitis subclínicas no son evidentes, debido a que la finalidad productiva del hato que cría el productor no es la leche y por lo tanto no realiza controles lecheros. Por el contrario, las pérdidas que ocasionan las mastitis clínicas de tipo gangrenosa son más directas y evidentes, ya que son expresadas en mortandad de cabras adultas, mortandad de cabritos y pérdida de la calidad y volumen de leche.

### **Diagnóstico:**

La detección de la mastitis clínica no ofrece dificultad, dada la evidencia observable en forma directa, no así para las subclínicas y las pérdidas asociadas a ésta última por lo que se debe detectar por medio de test indirectos, que tienen su variabilidad en cuanto a resultados e interpretación de los mismos, según la especie en que se aplique, por ej. en tambos lecheros bovinos se ha encontrado una estrecha relación entre el incremento de células somáticas correspondientes a mastitis subclínicas y la disminución de la producción de leche diaria, de sólidos totales, grasa y proteína (Pedraza *et al* 2000).

En diversos estudios en caprinos si bien corroboran que los niveles de producción láctea y su composición están altamente relacionados con el recuento de células somáticas (RCS) y el california mastitis test (CMT); no están definidos aún los umbrales de RCS para la detección de mastitis subclínicas, debido a la confusión que ocasionan las partículas intracelulares de las células epiteliales de la glándula, que son vertidas a la secreción láctea (Marín 2001 *et al* 2001y Velázquez 2012).

Por ej. Marín *et al* (2001) encontraron los siguientes valores en un estudio realizado a 73 cabras sanas tipo criolla chilena:

- a) Correlación entre RCS y producción: -0.96
- b) Correlación entre RCS y CMT izquierdo y derecho respectivamente: 0,97 y 0,95
- c) Producción diaria de leche: 1018,9 g.
- d) Producción total de leche por lactación (kg)  $105,9 \pm 34$
- e) Grasa (p.100)  $5,51 \pm 1,25$
- f) Sólidos totales (p.100)  $15,18 \pm 1,91$
- g) Proteína (p.100)  $4,20 \pm 0,85$
- h) Lactosa (p.100)  $4,74 \pm 0,25$
- i) RCS (cel/ml)  $450,4 \times 10^3 \pm 916,9$

Sánchez *et al* (2007) encontraron en cabras de raza Murciano Granadina umbrales de valores de RCS correlacionados positivamente con infecciones subclínicas persistentes (más de dos o tres muestreos positivos a un mismo agente infeccioso). Los valores fueron:  $1,218 \times 10^3$  cel/mL para infecciones persistentes.

Para glándulas no infectadas:  $341 \times 10^3$  cel/mL. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

Los valores logaritmizados fueron: 750 cel.  $\times 10^3$  /mL que clasifica correctamente el 73,28 % de las muestras con una sensibilidad del 61,11% y una especificidad del 74,18 %. El mismo valor expresado en media aritmética es de 1.450 cel.  $\times 10^3$  /mL (Sánchez *et al* 2007).

En referencia al tipo de bacterias aisladas, Folly *et al* (2009) encontraron a partir de 71 muestras de leche de cabra con RCS arriba de  $1,0 \times 10^6$ : *Staphylococcus* sp coagulasa positiva 8,45%;

*Staphylococcus* sp coagulasa negativa 69,02%; Enterobacterias 1,41%; sin crecimiento 19,72%, siendo el CMT con valor de 3+ los más adecuados para indicar infección en las ubres, no así valores inferiores (Folly *et al* 2011).

Estos estudios apoyan la teoría de que el RCS en cabras se puede utilizar como herramienta de control de las mastitis subclínicas combinada con una terapia antimicrobiana específica durante el secado.

## **OBJETIVOS GENERALES**

A la luz de los nuevos conocimientos generados durante los últimos años, la terapia antibacteriana debe ser replanteada desde su base.

A través del incremento del conocimiento sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, se pretende desarrollar esquemas de administración de antimicrobianos que aseguren eficacia antibacteriana y control de la presencia de residuos en la leche proveniente de cabras tratadas por mastitis subclínica.

En un país como el nuestro, que tiene que recuperar su estabilidad económica a través de la exportación, el aseguramiento de la calidad de los alimentos de origen animal es un problema insoslayable y la única forma de resolverlo es a través de la investigación, el desarrollo tecnológico y la extensión.

En este caso en particular tratándose la producción caprina de una explotación alternativa en clara expansión en nuestro país, es fundamental desarrollar esquemas terapéuticos de máxima eficacia que repercutan en la obtención de alimentos de excelencia internacional no solamente regional.

## **DETECCIÓN DE PROBLEMAS**

Es indudable que la mastitis es un problema mundial asociado a la alta producción, que da lugar a enormes pérdidas. La mastitis es considerada como la enfermedad más cara para el ganado vacuno de leche, diversos estudios en ganado lechero bovino dan cuenta de las pérdidas de mastitis clínicas y subclínicas, teniendo como referencia para este caso el umbral de RCS. Al respecto, expresan que superando éste, se producen pérdidas por producción y calidad. En cabras los resultados no son tan

contundentes, por ej. Suarez *et al* (2014) no encontraron diferencias en la producción láctea entre animales con mastitis y sin mastitis subclínicas en un rebaño con el 5% de prevalencia. Posiblemente en rodeos con prevalencia mayor pueda observarse diferencias significativas, por lo que se puede conjeturar por analogía a la situación dada en bovinos, una correlación negativa entre RCS y producción-calidad.<sup>1</sup>

La prevalencia de mastitis puede ser reducida previniendo su ocurrencia o reduciendo la duración de los casos que se presentan. Un buen manejo del tambo es fundamental en la disminución de los casos. Si bien cada vez se trabaja más en tratamientos alternativos a los quimioterápicos, los *antibióticos* siguen siendo una herramienta esencial, y su *uso racional* una necesidad imprescindible.

Se identifican tres problemas concretos frente a la utilización de antibióticos en animales productores de alimentos en general y en particular en el tratamiento de la mastitis caprina:

1- Uso ineficiente de drogas:

Terapéutica sin diagnóstico

Uso innecesario

No utilización cuando son indicadas

Uso de dosis inadecuadas

Períodos inter-dosis inadecuados

Asociación ineficiente o francamente antagónica de drogas

Extrapolación de esquemas terapéuticos diseñados para bovinos a los caprinos

Desconocimiento de los tiempos de retirada (y lo más grave, del concepto de retirada)

2- Desconocimiento del problema farmacocinético/farmacodinámico

3- Inexistencia en nuestro país de un severo control de residuos medicamentosos

Este fracaso terapéutico ocasionado por un **uso totalmente irracional de los antimicrobianos** en explotaciones lecheras alcanza varios sectores:

1.- Productivo: ocasionando, como mencionamos, importantes pérdidas económicas.

2.-Industrial: La elaboración de subproductos a partir de materia prima de deficiente calidad, también acarrea pérdidas económicas de magnitud y fundamentalmente impide la inserción en mercados

internacionales. Las empresas, fundamentalmente familiares, padecen desde simples pérdidas, hasta desastres financieros y deterioros de su prestigio.

3.- Salud pública: Aquí tenemos también varios tópicos a considerar:

a.- Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública, aún en los países más desarrollados. El mayor peligro que tiene la leche con estafilococos reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas.

b.- La presencia de residuos de antibióticos, dado el desconocimiento absoluto de los perfiles de depleción de los antimicrobianos administrados a la especie caprina.

c.- La transferencia de resistencias bacterianas a través de los alimentos de origen animal.

No debemos olvidar que higiene de la leche y salud pública, son dos aspectos que se conectan mediante una sola palabra, **CALIDAD**.

El uso irracional de los antimicrobianos se puede combatir mediante la implementación de esquemas terapéuticos racionales basado en los siguientes capítulos:

1.-***Pérfil microbiológico de la mastitis***. El diagnóstico clínico y de laboratorio (aislamiento, tipificación y antibiograma) es uno de los pilares fundamentales del uso racional de los agentes antimicrobianos.

2.-***Farmacocinética/Farmacodinamia de antibióticos en animales productores de leche sanos y portadores de mastitis***. La comprensión de esta relación PK/PD redundará en un aumento de la eficacia antimicrobiana y en una disminución de la selección de cepas resistentes, aspectos fundamentales que hacen al éxito de la terapia.

3.-***Diseño de formulaciones y de regímenes terapéuticos más eficaces y seguros***. El desarrollo de nuevos medicamentos debe involucrar más que el descubrimiento de una nueva sustancia, el aprovechamiento integral de sus efectos sobre el organismo, se debe considerar como se transporta la droga al sitio apropiado, y una vez allí lograr que esté disponible para su uso y que sea eficaz.

4.-***Establecimiento de los períodos de retirada para los antibióticos indicados para mastitis caprina*** siguiendo los protocolos y métodos armonizados, utilizados en los estados miembros de la comunidad europea y aplicados en nuestro país por el SENASA. Es decir incorporación de los aportes científicos

directamente al ámbito productivo regional, puesto que estos períodos de retirada serán calculados de acuerdo al tipo y nivel de producción.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS E HIPOTESIS DE TRABAJO**

### **Objetivos Particulares:**

- a) Desarrollar un estándar para la selección de animales portadores de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.* en cabras productoras de leche.
- b) Seleccionar mediante pruebas de susceptibilidad bacteriana, agentes antimicrobianos de uso rutinario en producción caprina de leche y dentro del siguiente menú:  **$\beta$ -lactámicos**: penicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cloxacilina, penetamato, cefalosporinas; **macrólidos**: azitromicina, claritromicina, espiramicina, tilmicosina; eritromicina, tilosina; **fluoroquinolonas**: enrofloxacina, danofloxacina, marbofloxacina.
- c) Calcular la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración bactericida mínima (CBM), efecto de primera exposición y efecto postantibiótico de los antibióticos seleccionados frente a las bacterias aisladas. Evaluar el poder bactericida del suero y la incidencia del pH en la CIM.
- d) Construir curvas de muerte bacteriana mediante el método basado en la concentración constante de antibiótico en caldo, suero y leche.
- e) Seleccionar el modelo farmacodinámico más adecuado para explicar la interacción fármaco-bacteria en función del tiempo.
- f) Determinar el comportamiento farmacocinético del  **$\beta$ -lactámico** seleccionado en plasma y en leche, luego de su administración en animales portadores de mastitis por *Staphylococcus spp.* de alta y baja productividad.
- g) Determinar el comportamiento farmacocinético del **macrólido** seleccionado en plasma y en leche, luego de su administración en animales portadores de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.* de alta y baja productividad.
- h) Determinar el comportamiento farmacocinético de la **fluoroquinolona** seleccionada en plasma y en leche, luego de su administración en animales portadores de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.* de alta y baja productividad.

- i) Correlacionar la CIM obtenida in vitro con los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva concentración en función del tiempo (ABC), concentración máxima (Cmax) y tiempo máximo (Tmax) obtenidos in vivo para establecer parámetros PK/PD predictores de eficacia.
- j) En base a los datos obtenidos seleccionar el antimicrobiano más adecuado para el tratamiento de *S. aureus* en cabras portadoras de mastitis subclínica.
- k) Diseñar un plan terapéutico racional con los valores obtenidos y corroborarlo a campo.
- l) Evaluar la cura bacteriológica y clínica post-tratamiento según el nuevo esquema terapéutico.
- ll) Establecer el período de retirada en leche para cada uno de antimicrobianos ensayados en animales de alta y baja productividad de acuerdo al método armonizado TTSC (Time to Safe Concentration) (EMEA, 1998).

**El proyecto se basa en la siguiente hipótesis:**

*El tratamiento antibacteriano de la mastitis caprina subclínica basado en conocimientos farmacocinéticos/farmacodinámicos que permitan diseñar planes de administración correctos, permitirá maximizar la eficacia terapéutica repercutiendo en la producción de alimentos de origen caprino libres de microorganismos patógenos y de residuos perjudiciales para salud pública e industria.*

**RELEVANCIA DEL PROBLEMA**

*“Clásicamente el control alimentario se ha dirigido hacia la identificación de EFECTOS, pero no al control de las causas que los originaron. Esto representa un problema, pues una vez producidos los efectos indeseables, las pérdidas de los sectores involucrados, ya se han generado”.*

Producir leche de buena calidad no solamente importa por su impacto en la salud pública, sino que también es un factor que estabiliza el desarrollo socio-económico en áreas rurales, particularmente en los países en desarrollo (De Boer 1981; McDowell 1981). Las exigencias de mayores cantidades de alimentos que tiene la población mundial, de cierta forma tienden a opacar una necesidad paralela en

cuanto a las cualidades nutritivas e higiénicas necesarias para satisfacer los requerimientos nutricionales establecidos.

Si bien son incuestionables las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, no es menos cierto que, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original.

Estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, alteración físico-química de sus componentes, adquisición de olores extraños y malos sabores y contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc. Todos estos riesgos, ya sea en forma aislada o en conjunto, conspiran en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, conspiran en contra de la salud pública y economía de cualquier país.

Es por ello que el desafío para quienes trabajamos en el tema, no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética. Tres aspectos que, unidos, pueden contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero caprino de nuestro país, con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las generaciones venideras.

La mastitis subclínica, solamente detectada por cambios en la composición de la leche aparentemente normal, constituye el problema más común y de mayor importancia económica en las explotaciones lecheras (Coetzer 1994). El *Staphylococcus aureus* constituye la principal causa de mastitis subclínica o mastitis clínica leve a moderada en bovinos (Erskine 2002; Prescott 1988; Mestorino 2012).

El mayor peligro que tiene la contaminación de la leche con estafilococos reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas. Esta enterotoxina es termoestable y los estafilococos que la producen se encuentran con mucha frecuencia en operarios aparentemente sanos y en el ganado. Este tipo de intoxicación alimentaria puede producirse, incluso, en leches correctamente pasteurizadas, bastando para ello que la leche haya permanecido a la temperatura favorable a la multiplicación de los



estafilococos durante el período necesario para la producción de una cantidad peligrosa de enterotoxina.

Por otra parte los residuos de antimicrobianos también inciden en los procesos de industrialización, retrasando o suprimiendo el proceso de fermentación del queso y reduciendo la calidad de la manteca. También existe preocupación por las eventuales toxicidades de los residuos lácteos. La presencia *de antimicrobianos* en leche de consumo en concentraciones residuales, siempre fue considerada un factor de selección de resistencias, aunque este es un tema en revisión.

La presencia de residuos químicos en alimentos es una de las mayores preocupaciones de los científicos que trabajan en el área, pero cada día más, los productores, técnicos, autoridades y especialmente, los consumidores aumentan su inquietud respecto de este tema, su importancia, su incidencia, y la mejor forma de evitarlos. Sin embargo, sigue existiendo un gran desconocimiento sobre el verdadero alcance de su impacto.

En general los estudios farmacocinéticos en cabras de leche son realizados en animales normales; el uso de animales con mastitis subclínica o clínica, homogéneamente seleccionados, puede contribuir a un mejor entendimiento de posibles tratamientos.

Probablemente, en los países realmente desarrollados desde el punto de vista lechero, los planes de administración diseñados por las empresas sean menos objetables, debido a la homogeneidad del rendimiento de los rodeos. Mientras que en el nuestro y en este tipo de producción caprina en particular, pese al elevado nivel alcanzado por muchas explotaciones, siguen existiendo explotaciones de escaso rendimiento y pobre perfil sanitario.

Nos preocupan sobremanera las diferencias en productividad en diferentes explotaciones caprinas. Creemos muy razonable esperar diferencias en tiempo de eliminación de antibacterianos cuando existen importantes diferencias en productividad y en salud de la glándula mamaria. El conocimiento de la incidencia de la productividad en la cinética de los medicamentos antimastíticos, permitirá tratamientos más racionales y representará no solamente una herramienta para una mayor eficacia de la terapia, sino que contribuirá a la disminución de riesgos para la salud pública y a un mayor rendimiento industrial a través de la reducción de presencia de inhibidores en leche.

Las moléculas antibacterianas han sido utilizadas por los veterinarios desde 1940, y la mastitis parece ser tan común hoy en día como antes de la introducción de los antimicrobianos.

El extenso uso de estos agentes resultó en selección de especies bacterianas resistentes y desarrollo de cepas bacterianas resistentes entre aquellas poblaciones que en un principio eran susceptibles, p. ej. Gentilini E. *et al* (200) menciona que de un total de 206 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis clínica y subclínica en bovinos entre los años 1996 y 1998, el 40% presentaron resistencia a la penicilina. Los patógenos de la mastitis altamente susceptibles a penicilina G (por ej. *Streptococcus agalactiae*) fueron prácticamente eliminados de las poblaciones bovinas de algunos países, pero al mismo tiempo, otras bacterias resistentes comenzaron a dominar. En países donde los antibióticos han sido utilizados por mucho tiempo, la prevalencia de infecciones por *Streptococcus* contagiosos ha disminuido y ha sido reemplazada por infecciones por *Staphylococcus*. De manera similar, las infecciones por Gram+ comenzaron a ser menos frecuentes cuando el post-dipping comenzó a practicarse, pero al mismo tiempo la prevalencia de infecciones agudas por Gram- pareció incrementarse. La terapia antimicrobiana comenzó a ser más y más dificultosa, a tal punto que es posible, conociendo las especies bacterianas asociadas con mastitis agudas en diferentes regiones, intuir la naturaleza de la terapia utilizada en un país en particular.

De tal manera que, si se extrapolan planes terapéuticos diseñados para bovinos de leche y que además gozan de una deficiente eficacia, a cabras portadoras de mastitis; desconociendo totalmente la prevalencia y sensibilidad de los microorganismos causales de mastitis, el perfil farmacocinético de los antimicrobianos administrados a cabras y por lo tanto desconociendo los determinantes PK/PD en la especie caprina, habrá una elevada probabilidad de obtener un fracaso terapéutico.

Históricamente un régimen de dosificación era determinado por parámetros farmacocinéticos (PK), sin embargo hoy se sabe que la farmacodinamia (PD) juega también, un rol muy importante. Es decir, la eficacia de los antimicrobianos in vivo, depende de su perfil PK como también de las propiedades PD de los mismos. Las concentraciones tisulares y en los fluidos orgánicos determinan los efectos farmacológicos y toxicológicos, mientras que la concentración en el sitio de infección determina el efecto antimicrobiano. De esta manera la aplicación de modelos PK/PD, conjuntamente con una apropiada elección de una enfermedad natural puede proveer información relevante en cuanto a los diseños e implementación de nuevos planes terapéuticos (Lucas 2009; Mestorino 2012). El objetivo general de esta parte experimental de la propuesta es evaluar posibles modificaciones PK y PD de diferentes antimicrobianos administrados por vía intramamaria o sistémica, asociados a mastitis subclínica en cabras productoras de leche.

Los parámetros farmacocinéticos, área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (ABC) y la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) han sido integrados con el parámetro farmacodinámico in vitro CIM (expresado como la CIM para el 90% de los aislamientos,  $CIM_{90}$ ) para obtener las relaciones ABC/CIM (ABIC) y  $C_{max}/CIM$ . Se ha demostrado que elevados valores de ABIC y  $C_{max}/CIM$  son importantes para aquellos antimicrobianos cuya actividad depende de la concentración lograda como son las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos. Algunos antimicrobianos como los betalactámicos, los macrólidos, glicopéptidos y otros agentes bacteriostáticos tienen efectos dependientes del tiempo de exposición, donde el lapso de tiempo durante el cual las concentraciones son mantenidas por encima de la CIM es importante; sin embargo, el aumentar la concentración por arriba de cierto límite no incrementa el efecto bactericida/bacteriostático (Hyatt *et al* 1995; Renard *et al* 1996).

Por otro lado existe una preocupación creciente acerca de que la selección de microorganismos patógenos de los animales constituya un riesgo en el futuro sobre la eficacia de los antimicrobianos más utilizados en animales de consumo y que pueda ser una amenaza para la salud humana debido a la transmisión de los microorganismos por los alimentos (Smith *et al* 1999). Se sabe ahora que las estrategias inapropiadas de administración pueden incrementar la velocidad con la cual las bacterias resistentes a antimicrobianos son seleccionadas. La relación farmacocinética-farmacodinamia que está asociada con el desarrollo de resistencia ha sido estudiada y para muchos antimicrobianos (cefalosporinas y fluoroquinolonas) el ABIC desde las 0 hasta las 24 h fue un importante indicador en el desarrollo de resistencia, lo cual mejoró cuando la exposición al antimicrobiano fue con un ABIC mayor a 100 (Thomas *et al* 1998).

Las diferencias en las especies tanto de hospedadores como de bacterias, el estado inmunitario y la localización de la bacteria (particularmente la localización intracelular) afectarán la relación farmacocinética-farmacodinamia. Las ABIC y las concentraciones usadas en la relación  $C_{max}/CIM$  en la literatura, obtenidas a partir de estudios en ratas neutropénicas han suministrado estimaciones conservadoras de éxito, cuando son trasladadas a animales domésticos inmunocompetentes. Más aún, la relación farmacocinética-farmacodinamia calculada con concentraciones plasmáticas no suministra predicciones precisas de eficacia en situaciones como en la mastitis estafilocócica. En esta situación, las concentraciones del antimicrobiano en el compartimiento mamario, y particularmente en la localización subcelular de las bacterias, son muy diferentes a las del plasma y la actividad de los compuestos puede también ser afectada por el ambiente ácido del fagolisosoma.

El conocimiento de la relación farmacocinética-farmacodinámica para los antimicrobianos permitirá el diseño de estrategias de dosificación, las cuales mejorarán la eficacia y reducirán el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos.

## **CONSTRUCCION DE LA HIPÓTESIS Y JUSTIFICACION GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO**

- 1.-El estado de enfermedad mamaria cambia las características de las glándulas mamarias y da lugar a cambios farmacocinéticos/farmacodinámicos que pueden repercutir en fallo terapéutico.
- 2.- Estos cambios ocasionados por la enfermedad pueden dar lugar a diferencias notables en los periodos de retirada de los medicamentos.
- 3.- Los *Staphylococcus spp* son microorganismos que expuestos a tratamientos inadecuados pueden inhibir su crecimiento y presentar, además, supervivencia intracelular. Por lo tanto antimicrobianos (como los  $\beta$ -lactámicos) que demuestran eficacia in vitro no la mantienen in vivo, pues no pueden alcanzar concentraciones efectivas a nivel subcelular.
- 4.- El nivel de producción (alta, baja) repercutirá en la extensión de los tiempos de retirada.
- 5.- Como los animales de baja producción se encuentran en general en establecimientos de manejo sanitario menos estricto y mayor nivel de mastitis, en éstos se utilizan más antibióticos y aumentan enormemente los riesgos.
- 6.- Animales de muy elevada producción pueden eliminar/diluir la droga suficientemente rápido como para disminuir el tiempo de contacto. y la eficacia.
- 7.- El uso racional de los antimicrobianos en animales portadores de mastitis subclínica basado en conocimientos PK-PD maximiza la eficacia y contiene el avance de la resistencia.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS**

El Trabajo de Tesis Doctoral estará dividido en tres capítulos estrechamente vinculados

***1.-Perfil microbiológico de la mastitis subclínica en cabras.***

***2.-Farmacocinética/Farmacodinamia de antibióticos en cabras productoras de leche portadoras de mastitis subclínica.***

***3.-Determinación de los períodos de retirada para los antibióticos ensayados siguiendo protocolos y métodos armonizados***

### **CAPÍTULO 1.-PÉRFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MASTITIS SUBCLÍNICA EN CABRAS**

#### **1.1. Selección de cabras y glándulas**

Se trabajará en establecimientos lecheros de las provincias de San Luis y/o San Juan. Las cabras admitidas para este estudio no deberán formar parte de ningún experimento paralelo, ni haber recibido medicación por lo menos durante los 30 días previos al inicio del mismo. Se les realizará una historia clínica, donde deberá constar: edad, tiempo y número de lactancia, producción diaria de leche, antecedentes de mastitis u otras enfermedades, tratamientos y vacunaciones anteriores. Las cabras serán ordeñadas en forma manual. Previo al ordeño las glándulas mamarias serán lavadas con agua tibia y secadas con toallitas de papel desechable (una por glándula), se realizará una meticulosa limpieza del pezón con alcohol isopropílico, con énfasis en la punta del pezón. Posteriormente al ordeño se sellarán los pezones con un iodóforo. Se deberá cuidar rigurosamente la higiene del proceso.

Las glándulas de todas las cabras serán muestreadas en dos días consecutivos para la selección de los casos subclínicos. Las muestras de leche serán cultivadas en agar sangre bovina dentro de las 24 hs de colección y se determinará, también, el número de células somáticas mediante un (6)-ISO 13366-1 Milk-Enumeration off somatic cells Part 1: Microscopic method (Nikon Eclipse E200 ®). Previo al SCC se identificarán como animales con mastitis a todo aquel, que mediante la prueba cualitativa del California Mastitis Test (CMT) arroje un grado de positividad de 3+.

Si el conteo de células somáticas (SCC) es 1000000 o mayor y si se aísla, en las dos ocasiones, *Staphylococcus aureus* o SCN, la glándula mamaria será elegida para la prueba subclínica. Si una sola de las dos muestras obtenidas es positiva, el diagnóstico se deberá confirmar con una tercera muestra (National Mastitis Council Inc. Madison, WI., 2004). La identificación de la especie *Staphylococcus* se

realizará mediante identificación de las colonias, coloración de Gram, prueba de catalasa y prueba de coagulasa en tubo. La cepa control que se utilizará para la prueba de coagulasa será *S. aureus* ATCC 25923.

## 1.2. Pruebas de susceptibilidad bacteriana

**Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana:** Una vez aislados los microorganismos se empleará la técnica de difusión de disco, este método se basa en la difusión de los agentes antimicrobianos mencionados desde un disco (preparado comercialmente y estandarizado o preparado en el laboratorio al efecto) colocado sobre una superficie de agar de crecimiento estandarizado y que será sembrado con aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (CFU)/mL de un cultivo puro de la bacteria aislada. Al aplicar el disco sobre la superficie del agar se iniciará una carrera entre el crecimiento de la bacteria sobre aquella y la difusión del fármaco a través del agar, esta difusión redundará en un gradiente de concentración del fármaco y en la formación de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Esta zona de inhibición se correlaciona de manera inversa con la CIM (concentración inhibitoria mínima) del microorganismo, es decir a mayor zona de inhibición, menor es la concentración del fármaco requerido para inhibir el patógeno. Se utilizará *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, como cepa de referencia (CLSI 2008).

De manera que a partir de esta prueba de susceptibilidad bacteriana se seleccionarán, según pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas y según nuestra experiencia, tres grupos de antimicrobianos a los cuales el *Staphylococcus aureus* y/o SCN sean altamente susceptibles:

1. Antibióticos acción **Tiempo dependientes con escaso/nulo efecto postantibiótico:**  $\beta$ -lactámicos (penicilina, cloxacilina, amoxicilina, cefalexina, cefoperazona) y macrólidos (eritromicina, espiramicina),
2. Antibióticos acción **Tiempo dependientes con prolongado efecto postantibiótico:** Macrólidos azálidos (azitromicina, telitromicina, claritromicina) y/o tetraciclinas y/o glicopéptidos y/o ansamicinas
3. Antibióticos acción **Concentración dependientes con prolongado efecto postantibiótico:** Fluoroquinolonas (danofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina) y aminoglucósidos (estreptomicina, neomicina, gentamicina)

**Prueba cuantitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana:** Una vez seleccionados los antimicrobianos a ensayar se procederá a la determinación de la CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> y de la CBM (concentración bactericida mínima) de cada uno de ellos a través de pruebas cuantitativas de microdilución en caldo. El procedimiento se realizará en placas de microtítulo, utilizando antibióticos de potencia conocida en diluciones dobles progresivas que sigan las concentraciones similares a las obtenidas en suero y tejidos en las dosis recomendadas (CLSI 2009).

Se realizará una suspensión bacteriana a partir de un cultivo nocturno o un cultivo en fase logarítmica del crecimiento bacteriano y se diluirá hasta una turbidez comparable al estándar de turbidez de McFarland 0.5 (aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL). Esta suspensión se volverá a diluir con agua estéril, solución salina o caldo de manera que la concentración bacteriana final sea de  $5 \times 10^4$  UFC/cubeta. Una vez inoculadas las cubetas, estas se colocaran en un incubador a 35°C y se incubaran durante 16-20 horas. En la lectura de las cubetas, la CIM será registrada como la menor concentración de cada uno de los antimicrobianos ensayados que inhibe por completo el crecimiento del organismo. La CIM y la CBM serán medidas sin ajustar el pH del caldo de cultivo (valor estándar a pH 7.4) y modificando el pH a 6 y a 5 para emular las condiciones de pH de los endosomas y lisosomas respectivamente, en donde suelen alojarse los *Staphylococcus spp.* a nivel subcelular.

**Evaluación de la cinética de muerte bacteriana. Construcción de curvas de crecimiento y muerte bacteriana:** Cepas bacterianas de Referencia y Problema (n = 6) serán enfrentadas a concentraciones fijas de los antimicrobianos seleccionados por las pruebas de susceptibilidad según el método explicado en los Procedimientos de Microbiología Clínica (García Rodríguez *et al.*, 2001). Se construirán curvas de crecimiento control sin antibiótico.

Se realizarán distintas curvas con concentraciones crecientes de los antibióticos en estudio, en principio estas concentraciones serán 0.25, 0.5, CIM, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM, la mínima concentración detectable en suero (MCDS); y una concentración intermedia entre la CIM y la MCDS.

Posteriormente se evaluará la incidencia del pH (7.4, 6.5, 5.5), del suero y de la leche sobre la curva de muerte bacteriana, simulando posibles condiciones *in vivo*.

### **1.3. Evaluación del efecto post-antibiótico (PAE) de los antibióticos utilizados frente a las cepas de *Staphylococcus* aisladas a campo.**

Se utilizará *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, como cepa de referencia para controlar a las cepas de *Staphylococcus* aisladas de los animales experimentales.

**Evaluación del PAE in vitro:** Se enfrentarán cultivos de *Staphylococcus* ( $10^7$  UFC/ml) en fase de crecimiento logarítmico a concentraciones terapéuticas de los antimicrobianos seleccionados. Se mantendrán a 37°C en un incubador durante 0.5 a 1.5 h. Paralelamente se realizará un cultivo control con el mismo microorganismo pero sin la adición de antimicrobiano.

Posteriormente los cultivos tratados y no tratados, previa centrifugación, serán divididos en 4 tubos. Un tubo de cada antibiótico con su correspondiente control será reincubado a 37°C durante 10 h y se tomarán muestras horarias a los efectos de determinar bacterias viables.

Los otros tres tubos con previa exposición al antibiótico serán enfrentados a los antimicrobianos nuevamente, pero a concentraciones 1/2, 1/4 y 1/8 de CIM. Se incubarán nuevamente durante 10 h y se obtendrán muestras a cada hora para determinar bacterias viables.

### **1.4. Análisis farmacodinámico por modelización matemática**

Los análisis farmacodinámicos de los datos obtenidos de las curvas de muerte bacteriana de las cepas de Referencia y Problema se realizarán mediante el empleo de modelos:

1. Modelos para la estimación de la velocidad de crecimiento bacteriano en función del tiempo en ausencia de antibiótico.
2. Modelos para el estudio de la evolución de la población bacteriana en función del tiempo respecto de una concentración fija de antimicrobiano.
3. Modelos para el estudio de la relación efecto antibacteriano versus concentración antibiótica
4. Modelos para la estimación de los valores de las constantes de muerte bacteriana.
5. Estimación de la MIC mediante modelos.
6. Modelos para la estimación de la duración del efecto posantibiótico.

Se analizarán los datos experimentales con los diferentes modelos farmacodinámicos y se seleccionará el más conveniente en función del tipo de bacteria, tipo de antibiótico utilizado y patrón de la cinética



de muerte bacteriana correspondiente. Los análisis matemáticos serán efectuados con la ayuda del programa informático WinNonlin Professional 6.3.

## ***CAPÍTULO 2. FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA DE ANTIBIÓTICOS EN CABRAS PRODUCTORAS DE LECHE Y PORTADORAS DE MASTITIS SUBCLÍNICA***

Este capítulo tiene por objetivo conocer el comportamiento farmacocinético en suero y en leche de cabras de los antimicrobianos seleccionados. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos se vincularán con los datos farmacodinámicos obtenidos *in vitro* (capítulo 1) y así poder establecer los correspondientes predictores de eficacia para cada antimicrobiano ensayado.

**2.1. Animales experimentales:** las cabras admitidas para este estudio no deberán formar parte de ningún experimento paralelo. Siguiendo el protocolo enunciado en el **Capítulo 1**, se seleccionarán 12 cabras portadoras de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.* por antibiótico (36 animales en total), todos los grupos deberán estar integrados por un 50% de los animales de alta producción y otro 50% con animales de baja producción (el punto de corte se establecerá tomando la producción media del establecimiento). Es decir se conformarán 3 lotes de 12 animales cada uno.

Previamente a la administración de cada antimicrobiano a ensayar, las cabras serán ordeñadas. Previo al ordeño las glándulas mamarias serán lavadas con agua tibia y secadas con toallitas de papel desechable (una por medio mamario). Posteriormente al ordeño se sellarán los pezones con un iodóforo.

### **2.2. Administración de los antimicrobianos**

**Lote Número 1:** doce cabras (de baja y alta producción) portadoras de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.*, recibirán la dosis estipulada para el **beta-lactámico** seleccionado por su mejor perfil farmacocinético/farmacodinámico según los ensayos realizados en el **Capítulo 1**.

**Lote Número 2:** doce cabras (de baja y alta producción) portadoras de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.*, recibirán la dosis estipulada para el **macrólido** seleccionado por su mejor perfil farmacocinético/farmacodinámico según los ensayos realizados en el **Capítulo 1**.

**Lote Número 3:** doce cabras (de baja y alta producción) portadoras de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.*, recibirán la dosis estipulada para la **fluoroquinolona** seleccionada por su mejor perfil farmacocinético/farmacodinámico según los ensayos realizados en el **Capítulo 1**.

**Procedimiento común a los tres lotes experimentales:** Se obtendrán muestras de sangre y de leche previamente a la administración de cada antimicrobiano a evaluar, constituyendo así las muestras cero o controles negativos. En el caso que se aplique un esquema de dosis múltiple (por ejemplo tres dosis cada 12 horas), se obtendrán muestras de sangre y de leche post cada administración a los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 6, 8 y 12 h; y finalmente a los siguientes tiempos post-última administración: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h.

Las muestras de sangre serán extraídas a través de un catéter colocado en la vena yugular izquierda, se separará el suero por centrifugación. Las muestras de leche se obtendrán mediante ordeño manual. Previamente a la obtención de cada muestra de leche, las glándulas mamarias serán lavadas con agua tibia y secadas con toallitas de papel desechable (una por medio mamario).

El suero y la leche obtenidos a los diferentes tiempos horarios, serán divididos en dos alícuotas:

A.- Para evaluar el comportamiento PK/PD ex vivo, alícuotas (0.3 mL) de suero y de leche (previamente esterilizada por autoclave) de cada tiempo de muestreo serán inoculadas con 5  $\mu$ L de cultivo bacteriano de *Staphylococcus spp.* en fase estacionaria a los efectos de lograr una concentración de aproximadamente  $3 \times 10^7$  UFC/mL. A partir de este inóculo inicial se prepararán diluciones seriadas con solución salina estéril (rango entre  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$ ) con el fin de efectuar la determinación de las UFC en cada muestra sérica y láctea obtenida. Estas diluciones inoculadas con *Staphylococcus* serán incubadas por 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. A cada tiempo mencionado, una alícuota de 20  $\mu$ L será sembrada sobre TSA y las UFC serán contadas tras 16-18 h de incubación a 35°C. De manera que se construirán curvas de muerte bacteriana con cada concentración de antimicrobiano presente en cada tiempo cinético. Se considerará un límite de detección de 10 UFC/mL. Este ensayo nos permitirá una vez determinadas las concentraciones existentes en suero y en leche de cada antimicrobiano realizar una modelización PK/PD más aproximada a lo acontecido en condiciones in vivo. Se comparan estadísticamente los predictores de eficacia obtenidos ex vivo con aquellos obtenidos por simulación matemática en el capítulo 1.

B.- El volumen de suero y leche restantes serán destinados para la cuantificación del antimicrobiano correspondiente.

## 2.2. Cuantificación de las concentraciones de antimicrobianos en las muestras obtenidas

Las concentraciones de  $\beta$ -lactámico, macrólido y fluoroquinolona en suero y leche serán determinadas por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): HPLC/UV y/o HPLC/fluorescencia o por método microbiológico; tras la extracción del principio activo utilizando técnicas de extracción líquido/líquido o líquido/sólido –SPE- según el antimicrobiano a ensayar. Se evaluará el porcentaje de unión a proteínas mediante filtros Ultrafree-MC Centrifugal filter Unit, entonces la fracción de droga libre (activa) surgirá de la relación entre la concentración en el suero y en el ultrafiltrado:

$$f_i = \frac{\text{Concentración ultrafiltrado}}{\text{Concentración total}}$$

Con los datos de concentración en función del tiempo obtenidos para cada antimicrobiano, se realizará el análisis del comportamiento PK.

Se trabajará con técnicas analíticas validadas en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT). Se realizará una re-validación de cada una de ellas evaluando los siguientes parámetros: Linealidad, Precisión, Exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

## 2.3. Análisis farmacocinético, discriminación de modelo y determinación de parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos

Una vez cuantificadas las concentraciones de los tres grupos de antimicrobianos en función del tiempo para los diferentes ensayos realizados se tabularán y se procederá al análisis computarizado de los datos obtenidos. El análisis farmacocinético de los datos obtenidos será realizado utilizando el paquete informático WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

El modelo farmacocinético que mejor describa la cinética sérica y láctea del antibiótico ensayado será discriminado por medio del Test MAICE (Minimum Akaike Information Criterion) ([Yamaoka et al 1978](#)), que se basa en el criterio de información de Akaike ([1976](#)). También se realizará un análisis no compartimental basado en la teoría de los momentos estadísticos. Las áreas bajo la curva concentración en función del tiempo se calcularán por el método de los trapezoides ([Baggot 1978](#)).

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos serán relacionados con los datos de susceptibilidad bacteriana (PK/PD modelling). Los factores que intervienen al calibrar un régimen posológico incluyen, entre otras cosas, la susceptibilidad del patógeno en términos de la CIM, la concentración del

agente antimicrobiano en el foco infeccioso en forma activa (propiedades farmacocinéticas) y las propiedades farmacodinámicas del antimicrobiano.

En el caso del  $\beta$ -lactámico debemos lograr que la concentración en el foco infeccioso se encuentre el mayor tiempo posible por encima de la CIM. Es decir, esta clase de antimicrobianos pertenece al grupo de antibióticos acción tiempo dependiente con nulo a mínimo efecto post-antibiótico por lo cual la meta del régimen de dosificación debe apuntar a optimizar la duración de la exposición debido a que el tiempo durante el cual la concentración alcanzada está por encima de la CIM es el parámetro que mejor se correlaciona con la eficacia. La máxima muerte bacteriana se puede observar cuando el tiempo por encima de la CIM es entre un 50% - 70% del intervalo de dosis. El parámetro que se correlaciona con la eficacia es el  $t/CIM$

Para el caso de los macrólidos (por ej. tilmicosina) debemos lograr optimizar la cantidad diaria de antibiótico administrado, estos antimicrobianos pertenecen al grupo acción tiempo dependiente con prolongada persistencia. El parámetro que mejor se correlaciona con la eficacia es la relación  $ABC/CIM$ .

Finalmente, para las fluoroquinolonas, antibióticos acción concentración dependiente con prolongada persistencia, el objetivo de la dosificación debe ser alcanzar maximizar las concentraciones en el foco infeccioso, por lo cual los parámetros que mejor se correlacionarán con la eficacia son las relaciones  $C_{max}/CIM$  y  $ABC/CIM$ , pues a mayor concentración será más extensa y rápida la muerte bacteriana.

#### **2.4. Modelización PK/PD**

La modelización PK/PD será realizada utilizando el paquete informático WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

Con la CIM obtenida *in vitro* y los parámetros farmacocinéticos determinaremos los siguientes predictores de eficacia:  $C_{max}/CIM$ ,  $ABC_{24}/CIM$  -ABIC- y  $T>CIM$ .

Se establecerá la relación entre el parámetro  $ABC_{24}/CIM$  obtenido *ex vivo* y la diferencia, expresada en  $\log_{10}$ , entre el conteo bacteriano inicial (UFC/mL) y el conteo bacteriano luego de 24 h de incubación usando el modelo Sigmoideo Inhibitorio utilizado el programa WinNonlin 6.3:

$$E = \frac{((Emax - E_0) \times C_e^N)}{(EC_{50}^N + C_e^N)}$$

Donde:

*E*: Efecto antibacteriano medido como el cambio en el conteo bacteriano en suero (en  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL) luego de 24 h de incubación comparado con el conteo inicial  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL.

*E<sub>max</sub>*: Es la diferencia en  $\text{Log}_{10}$  en el conteo bacteriano entre 0 y 24 h en la muestra control sin antimicrobiano (muestra sérica obtenida al tiempo 0)

*E<sub>0</sub>*: Es la diferencia en  $\text{log}_{10}$  en el conteo bacteriano en la muestra conteniendo antimicrobiano luego de 24 h de incubación, cuando el límite de detección de 10 UFC/mL ha sido alcanzado.

*EC<sub>50</sub>*: Es el  $\text{ABC}_{24}/\text{CIM}$  que produce 50% del efecto antimicrobiano máximo

*C<sub>e</sub>*: Es el  $\text{ABC}/\text{CIM}$  en el compartimento del efecto (en ex vivo es el suero)

*N*: Es el coeficiente de Hill.

Con los datos obtenidos del conteo de colonias viables también se determinarán: Porcentaje de sobrevida bacteriana (PSB) a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h;

Índice de sobrevida bacteriana (ISB) entre 0-2, 0-4, 0-6, 0-8, 0-12 y 0-24 h;

Actividad bacteriostática y bactericida

Menor concentración de antimicrobiano efectiva

Concentración bactericida óptima

## **2.5. Diseño y corroboración a campo de un régimen de dosificación racional**

**2.5.1. Diseño:** Con los resultados obtenidos se seleccionará el antimicrobiano que presente mejor actividad bactericida. Esto significa que logre la concentración y/o el tiempo de contacto adecuado para atacar al *Staphylococcus spp.* según pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas.

**2.5.2. Corroboración a campo:** Se seleccionarán, según se detalló en selección de los animales experimentales, 6 cabras en producción portadoras de mastitis subclínica por *Staphylococcus spp.*

Los animales experimentales serán tratados con la formulación antimicrobiana elegida siguiendo el nuevo protocolo diseñado. Se obtendrán muestras de leche a los 20 y 30 días post-tratamiento con el objetivo de corroborar cura bacteriológica.

### ***CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE RETIRADA PARA CADA ANTIMICROBIANO ENSAYADO EN ANIMALES DE ALTA Y BAJA PRODUCTIVIDAD DE ACUERDO AL MÉTODO ARMONIZADO TTSC (TIME TO SAFE CONCENTRATION)***

El TTSC (Time to Safe Concentration) fue elegido como método armonizado por la Comunidad Europea. Se utilizará el programa WTM 1.3 desarrollado por la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA). Este método calcula el límite de tolerancia sobre el número de ordeños por animal. Este límite de tolerancia es el tiempo necesario para que la concentración residual en la leche de la mayoría de los animales alcance una concentración segura (Límite máximo de residuos). El tiempo de retirada es calculado con un límite de tolerancia del 95/95, es decir, un límite de confianza superior del 95% en el 95% de la población de los tiempos individuales.

## CRONOGRAMA DE TRABAJO:

CRONOGRAMA DE TRABAJO EN MESES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36								
CAPÍTULO 1.-PÉRFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MASTITIS SUBCLÍNICA EN CABRAS																																												
1.1. Selección de cabras y glándulas	X	X	X	X	X																																							
1.2. Pruebas de susceptibilidad bacteriana y Evaluación de la cinética de muerte						X	X	X																																				
1.3. Evaluación del efecto post-antibiótico (PAE) de los antibióticos utilizados frente a las cepas de Staphylococcus aisladas a campo y Evaluación del PAE in vitro							X	X	X																																			
1.4. Análisis farmacodinámico por modelización matemática								X	X	X	X																																	
CAPÍTULO 2. FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA DE ANTIBIÓTICOS EN CABRAS PRODUCTORAS DE LECHE Y PORTADORAS DE MASTITIS SUBCLÍNICA																																												
2.1. Animales experimentales (conformación de grupos)											X	X	X	X	X																													
2.2. Administración de los antimicrobianos															X	X	X	X																										
2.2. Cuantificación de las concentraciones de antimicrobianos en las muestras obtenidas																X	X	X	X																									
2.3. Análisis farmacocinético, discriminación de modelo y determinación de parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos																					X	X	X	X																				
2.4. Modelización PK/PD																						X	X	X	X																			
2.5. Diseño y corroboración a campo de un régimen de dosificación racional																											X	X	X	X														
CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE RETIRADA PARA CADA ANTIMICROBIANO ENSAYADO EN ANIMALES DE ALTA Y BAJA PRODUCTIVIDAD DE ACUERDO AL MÉTODO ARMONIZADO TTSC (TIME TO SAFE CONCENTRATION)																																												
INFORME FINAL																																						X	X	X	X	X	X	X

## BIBLIOGRAFÍA

1. -Baggot, JD. Principios de Farmacología Clínica Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 1978.
2. -Bazan R *et al.* Prevalencia de mastitis subclínica en cabras lecheras en Michoacán, México; Prevalence of Subclinical Mastitis in Dairy Goats in Michoacan, México. Rev. cient. (Maracaibo), 2009, vol. 19, no 4, p. 334-338.
3. -Bergonier D *et al.* Mastitis of dairy small ruminants. Veterinary research, 2003, vol. 34, no 5, p. 689-716.
4. -Clavijo A *et al.* Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. Zoot. Trop, 2002, vol. 20, p. 383-395.
5. -CLSI (2008) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, 3rd edn. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, USA.
6. -CLSI (2009) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute.
7. -Coetzer J, Thomson G, Tustin R (1994). Infectious diseases of livestock. Vol 2:1564-1595.
8. -De Boer A (1981). Socio-economic aspects of dairying in developing countries. Journal of Dairy Science, 64:2453-2463.
9. -Erskine R (2002) Empleo de Fármacos antimicrobianos en la mastitis bovina. Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria. Ed. J.F.Prescott, J.D.Baggott and R.D..Walker. Editorial Intermédica Pg. 613-642.
10. -Folly M *et al.* Evaluación de recuento de células somáticas, prueba de California Mastitis y composición química de leche de cabra. JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal: 2011. 4 (7): 247 – 258.
11. -Folly, M *et al.* Evaluación de recuento de células somáticas, prueba de California Mastitis y composición química de leche de cabra, 2009.
12. -García Rodríguez, J.A., Cantón, R., García Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez Martínez, L., Rodríguez-Avial, C. y Vila, J. (2001) Métodos Especiales para el Estudio de la



Sensibilidad a los Antimicrobianos. En Juan J. Picazo Editor: Procedimientos en Microbiología Clínica; SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Primera Edición. España.

13. -Gentilini, E., et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of dairy science*, 2000, vol. 83, no 6, p. 1224-1227.
14. -Hyatt M, Mc Kinnon P, Zimmer G, and Schentag J (1995). The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. *Clinical Pharmacokinetic Concepts*, 28, 143-160.
15. -Lucas M.F. (2009) Alternativas terapéuticas para el manejo racional de la mastitis subclínica por *Staphylococcus aureus*. Junio 2009. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Director: Dra. Nora Mestorino.
16. -Marín P, Burrows J, Ramos J. Producción y calidad de leche caprina en rebaños bajo sistema de manejo extensivo de la zona central de Chile. *Arch Zootec*, 2001, vol. 50, p. 363-366.
17. Mc Dowell R (1981). Limitations for dairy production in developing countries. *Journal of Dairy Science*, 64:2463-2474.
18. -Mestorino Nora and Errecalde Jorge (2012): **Book title:** A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. 626 pages, February 2012. **Book title:** *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment*. Cap. 22 Pag.423-472. ISBN 979-953-307-413-8. Book edited by: Dr. Carlos C. Pérez Marín.  
<http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/pharmacokinetic-pharmacodynamic-considerations-for-bovine-mastitis-treatment>
19. -Micheloud J *et al.* Brote de mastitis clínica por *Corynebacterium* spp. y *Streptococcus dysgalactiae* en cabras en Salta, Argentina. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 2014, vol. 40, no 1, p. 34-37.
20. -Pedraza C, Mansilla A, Fajardo P y Agüero H (2000). Cambio en la producción y composición láctea por efecto del incremento de células somáticas en leche de vacas. *Agricultura Técnica*, 60 (3), 251-258. Recuperado el 12 de mayo de 2014, de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072000000300005](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072000000300005&lng=es&tlng=es)
21. -Prescott J y Baggot J (1988). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Scientific Publications, pg: 321-331.

22. -Renard L, Sanders P, Laurentie M. And Delmas J (1996). Pharmacokineticpharmacodynamic model for spiramycin in staphylococcal mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 95-103.
23. -Sánchez A et al. Relación entre edad y prevalencia de infecciones intramamarias subclínicas caprinas. XVIII Jornadas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 1993, p. 117-182.
24. -Sánchez J, Salgado J, Ramos V. Niveles de células somáticas y prevalencia de mastitis en hatos caprinos del municipio de Mapimi, Durango, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*, 2007, vol. 6, p. 235-238.
25. -Silauí R, Ploszaj A. Rol Social de la ganadería: un enfoque sobre el aporte social de la ganadería de caprinos y ovinos en la Argentina. 32° Congreso de Producción Animal -AAPA-2009-Malargüe, Pcia. de Mendoza-Argentina.
26. -Smith K, Besser J, Hedberg C, Leano Fe, Bendor J, Wicklund J, Johnson P, Moore K, and Osterholm M (1999). Quinolone-resistance *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota. *The New England Journal of Medicine*, 340, 1525-1532.
27. -Sticotti E, José A, Mació M, Bérqamo E, Schneider M, y Magnano G. . Agentes bacterianos presentes en la leche de cabras con mastitis clínicas en sistemas de cría extensivos 2013. Primer Congreso Caprino. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Grupo Sanidad en Rumiantes.
28. -Suarez H, et al. Relaciones entre el recuento de células somáticas, test de mastitis California, conductividad eléctrica y el diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras. *Sanidad Animal en el INTA*, 2014, vol. 40, no 2, p. 145.
29. -Thomas J, Forrest A, Bhaunani S, Hyatt J, Cheng A, Ballow C and Schentag J (1998) Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely III patients during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 5210-5217.
30. -Velázquez F, Hernández L, Díaz E. Evaluación de la prueba modificada de anillo en leche para el diagnóstico de *Brucella melitensis* en caprinos y efecto de la mastitis sobre la prueba. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2012, vol. 35, no 1.
31. -Yamaoka k, Nakagawa T, and T. Uno (1978) Application of Akaike.s Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equation. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 6, 165-175.

---