

Trabajos de revisión**TILMICOSINA: UN NUEVO ANTIBIÓTICO MACRÓLIDO DE USO VETERINARIO****N Mestorino, JO Errecalde**

Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. INCAM, Verónica-Cañuelas, Buenos Aires

Resumen: La tilmicosina (TMS) es un antibiótico macrólido, sintetizado a partir de la tilosina, desarrollado exclusivamente para ser usado en medicina veterinaria. Tiene muy buena actividad contra microorganismos gram positivos, con actividad significativa contra ciertas bacterias gram negativas y micoplasmas. La tilmicosina, como todos los macrólidos, es bacteriostática, aunque puede ser bactericida a altas concentraciones y frente a determinados microorganismos. El perfil farmacocinético de la tilmicosina se caracteriza por bajas concentraciones plasmáticas, pero altas y persistentes concentraciones tisulares. Aunque las concentraciones plasmáticas fueron tradicionalmente las que orientaron la actividad antibiótica, es evidente que las concentraciones tisulares son un mejor indicador de llegada al sitio de la infección. El comportamiento farmacocinético de la tilmicosina con elevadas concentraciones tisulares sugiere elevada eficacia. Este artículo hace una revisión del mecanismo de acción, actividad antimicrobiana, comportamiento farmacocinético-farmacodinámico e indicaciones de este novedoso agente antimicrobiano.

Palabras clave: macrólidos, tilmicosina, farmacocinética, farmacodinamia, eficacia, residuos

TILMICOSIN: A NEW MACROLIDE ANTIBIOTIC FOR VETERINARY USE

Abstract: Tilmicosin (TMS) is a macrolide antibiotic, synthesized from tylosin, exclusively developed for in veterinary use. It has a very good activity against Gram-positive microorganisms, with significant activity against certain Gram-negative bacteria and mycoplasma. Tilmicosin is bacteriostatic, like all macrolide antibiotics, although the drug may be bactericidal in high concentrations against selected organisms. The pharmacokinetic profile of tilmicosin is characterized by low plasma drug concentrations but high and persistent tissue concentrations. Although plasma drug concentrations are the traditional predictors of antibiotic activity, it is clear that tissue concentrations are a better indicator of presence of the drug in the infection site. The pharmacokinetic characteristics of tilmicosin with high tissue concentrations suggests high efficacy. This article presents a revision of the mechanism of action, antimicrobial activity, pharmacokinetic-pharmacodynamic profile and indications of this novel antimicrobial agent.

Key words: Macrolides, Tilmicosin, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic, Efficacy, Residues

Fecha de recepción: 02/07/04

Fecha de aprobación: 09/11/04

Dirección para correspondencia: Nora Mestorino CC 296 (B1900AVW) La Plata, Argentina. Tel/Fax: 0221-4257980.

E-mail: noram@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos han provisto a los veterinarios de herramientas excepcionalmente poderosas para el tratamiento y control de las enfermedades bacterianas. Las estrategias para su uso han estado basadas esencialmente en la manutención de concentraciones (usualmente en plasma) superiores a aquellas que inhiben el crecimiento del organismo *in vitro* (concentración inhibitoria mínima - CIM). También ha sido sugerido que concentraciones múltiples de la CIM pueden ser un indicativo de un éxito seguro. Un conocimiento más acabado de los mecanismos de actividad antimicrobiana ha llevado al entendimiento de que estrategias específicas de exposición para antimicrobianos con mecanismos de acción particulares, conferirán mayor eficacia a las drogas.

La quimioterapia antibacteriana enfrenta varios desafíos. Se necesita penetrabilidad a tejidos escasamente accesibles, lo que se mide a través de un elevado volumen de distribución y penetrabilidad a células, en las que se acantonan determinados microorganismos que generan infecciones persistentes. Una elevada eficacia es crucial, la que está inevitablemente vinculada a una prolongada persistencia (que dará lugar a un prolongado tiempo de contacto en el sitio en que se encuentra el agente etiológico). En general, un amplio espectro de acción es importante, si bien con determinados fármacos un espectro estrecho puede ser bueno frente a un diagnóstico definido.

La tilmicosina (TMS) es un antibiótico macrólido, sintetizado a partir de la tilosina, que ha estado disponible en los Estados Unidos desde 1992 y ha sido aprobado para el tratamiento de la enfermedad respiratoria asociada con *Pasteurella* y especies de *Mycoplasma* (1, 2, 3, 4) en ovinos, bovinos de carne y vacas en el período de secado; también fue aprobado su uso en porcinos como aditivo de los alimentos para el control de enfermedades respiratorias asociadas con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *P. multocida* (5, 6).

De la relación pH corporal - pKa de la tilmicosina podemos afirmar que es un antibiótico predominantemente no ionizado, altamente liposoluble y parcialmente ligado a proteínas. Estas características le permiten pasar a través de las membranas celulares y distribuirse en el cuerpo del animal rápida y ampliamente. La tilmicosina es incorporada y transportada fundamentalmente por los macrófagos y polimorfonucleares activados. Pasa

a través de la pared de estas células blancas llegando al lisosoma. Una vez que los macrófagos toman contacto con las bacterias, comienzan a emitir pseudópodos con el fin de englobarlas y esta pasa al contenido celular del macrófago y de allí al lisosoma donde existe tilmicosina, produciéndose dos acciones: por un lado la tilmicosina afecta la síntesis proteica bacteriana evitando la multiplicación y por el otro las enzimas lisosomales destruyen a la bacteria. Es por esta razón que llega al pulmón o cualquier tejido comprometido rápidamente, obteniéndose concentraciones mayores a 3,12 µg/ml y permaneciendo en el sitio de infección en altas concentraciones por lo menos hasta 72 horas post aplicación.

Debido a la TMS que es una base orgánica débil, tiende a concentrarse en sitios ácidos. A medida que avanza el grado de neumonía, disminuye la habilidad de efectuar el intercambio dióxido de carbono-oxígeno, aumentando los niveles del primero y, por consiguiente, disminuyendo el pH. Estas características explican porqué la TMS alcanza altas y persistentes concentraciones en los tejidos (que siempre tienen un pH algo inferior al del plasma), más aún en aquellos que se encuentran infectados, e inclusive en tejidos consolidados donde el pH es aún más bajo.

Para el tratamiento de la Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB), pietín y queratoconjuntivitis es deseable encontrar un producto que tenga, no solamente actividad bactericida contra los agentes etiológicos, sino una excelente penetrabilidad en tejidos poco accesibles y/o patológicamente comprometidos.

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La fórmula molecular de la tilmicosina es: $C_{46}H_{80}N_2O_{13}$ (Fig. 1), con un peso molecular de 869.15. Es soluble en solventes orgánicos como hexano, acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etil acetato, metanol y tetrahidrofurano; su solubilidad en agua es dependiente de la temperatura y del pH.

El producto comercial está constituido por una mezcla de 82-88% del isómero cis y un 12-18% del isómero trans. Las formulaciones disponibles de tilmicosina incluyen inyectables para ser administrados por vía subcutánea en bovinos y ovinos a razón de 10 mg/kg de peso en dosis única y formulaciones orales para porcinos a razón de 200-400 mg/kg de alimento durante 10 a 21 días, equivalente a 8-20 mg/kg por día.

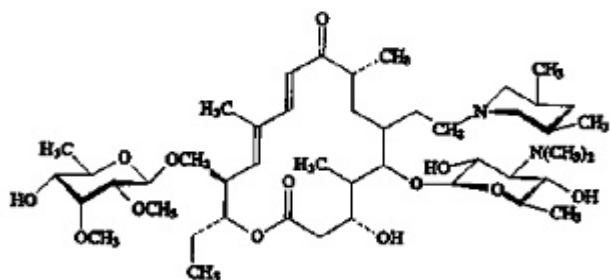


Fig. 1. Estructura química de tilmicosina.
Fig. 1. Tilcomisin chemical structure

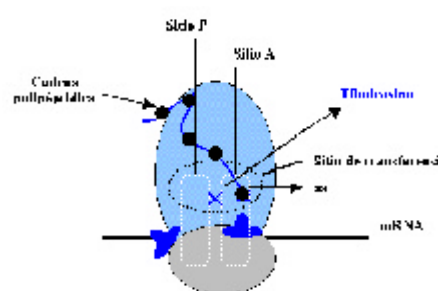


Fig.2. Mecanismo de inhibición de la síntesis proteica bacteriana por antibióticos macrólidos.

Fig.2 Protein synthesis inhibition mechanism by macrolide antibiotics.

ESPECTRO

La tilmicosina tiene amplio espectro, con actividad muy significativa frente a bacterias Gram positivas, ciertas Gram negativas y micoplasmas:

Microorganismo	MIC (mg/ml)
<i>Pasteurella haemolytica</i>	3,12 *
<i>Pasteurella multocida</i>	6,25 *
<i>Haemophilus somnus</i>	6,25 *
<i>Mycoplasma dispar</i>	0,097 *
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	0,024 *
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,78 *
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,12 *
<i>Actinomyces pyogenes</i>	0,024 *
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1,56 *
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0,195 *
<i>Moraxella bovis</i>	1 **
<i>Clostridium perfringens</i>	3,12 *
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3,12 *

* Ose, EE (5)

** Zielinski & Piscitelli, (7)

MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos macrólidos son agentes bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica por su unión reversible a la subunidad ribosomal 50S del microorganismo sensible (Fig. 2), en donde pueden interferir con la formación de complejos de iniciación para la síntesis de cadenas de péptidos o con las reacciones de aminoacil translocación. Esto impide a la bacteria continuar con su ciclo vital.

BASES FISIOPATOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS

Los bovinos son especialmente susceptibles a la enfermedad respiratoria debido a varias razones: tienen un espacio muerto superior al de otras especies; los alvéolos y bronquiolos terminales carecen de ventilación colateral, por lo que la obturación de solamente un conducto u orificio, da lugar al bloqueo de uno o más alvéolos; la hipoxia, que se produ-

ce hacen que, con mayor facilidad que en otras especies, se genere un efecto vasoconstrictor que empeora el fenómeno. El bovino tiene un pobre sistema fibrinolítico, que complica aún más la limpieza del sistema bronquial terminal y alveolar. El "feedlot" agrega poderosas razones ambientales a la susceptibilidad basada en las razones anteriores.

Cuando a todo lo antedicho se suma una zona de consolidación pulmonar, se genera un gran desequilibrio que da lugar a una mala oxigenación y a una disminución de la capacidad fagocítica.

La pasteurelosis neumónica es una enfermedad de los animales domésticos de particular incidencia en terneros en feedlot (8, 9), siendo *Pasteurella haemolytica* A1 el agente etiológico más común (10). Los factores de virulencia de los microorganismos y la inflamación que sufre el pulmón son los responsables de la injuria tisular asociada a la falla respiratoria en la neumonía bacteriana.

Las células eucarióticas, como los polimorfo nuclear neutrófilos (PMN), pueden morir por dos procesos distintos: necrosis y apoptosis (11, 12, 13). Cuando mueren por necrosis, la célula se podría decir que estalla, derramando compuestos proteolíticos en los tejidos circundantes y amplificando la inflamación local. Se trata de una muerte celular abrupta y desorganizada. En cambio a través del proceso apoptótico, las organelas citoplasmáticas se mantienen intactas, la cromatina nuclear se condensa y se adhiere a mono y oligonucleosomas (13). La preservación de la integridad de la membrana en los PMN apoptóticos ayuda a minimizar la inflamación y la subsiguiente injuria (13). Por otra parte, en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana y son rápidamente fagocitadas por los macró-

fagos (13, 14, 15, 16). Este proceso termina de "empaquetar" a la célula apoptótica impidiendo la descarga y jugando un rol esencial en la resolución de la enfermedad.

Estudios recientes sugieren que la capacidad de inducción de apoptosis de los neutrófilos por la TMS puede tener efectos antiinflamatorios (17, 18). La acumulación local de PMN y leucotrienos B4 en el sitio de inflamación juega un rol central en la patogénesis de la pasteurelisis bovina (9, 19, 20; 21). Los PMN liberan grandes cantidades de reactivos oxidados y enzimas proteolíticas que fijan a la bacteria invasora y paralelamente dañan el epitelio bronquial. Estos productos del hospedador conjuntamente con las leucotoxinas, contribuyen a retrasar la eliminación de *P. haemolytica* y la subsiguiente inflamación crónica.

La eficacia clínica de la TMS en el tratamiento de la neumonía por pasteurelisis ha sido atribuida a su comportamiento farmacodinámico en los tejidos apropiados (22, 23, 24) y a bajas concentraciones inhibitorias (25), además del efecto antiinflamatorio mencionado.

FARMACOCINÉTICA - FARMACODINAMIA

La concentración de tilmicosina generalmente es baja en el suero bovino pero muy alta en tejidos. Este antibiótico tiene una fuerte interacción con fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos de sangre, pulmón y glándula mamaria) y con las células epiteliales de la glándula mamaria. Presenta una distribución subcelular que se manifiesta en un 70-80% a nivel lisosomal. Esta integración representa un papel fundamental en la eficacia de la misma frente a microorganismos intracelulares (26). La tilmicosina se acumula en pulmón y los procesos infecciosos e inflamatorios aumentan su penetración tisular (27). Se puede decir, por lo tanto que la droga se concentra en células más que en plasma y en el fagolisosoma más que en el citoplasma.

El efecto post antibiótico (PAE) es la capacidad de un determinado agente de mantener actividad antibacteriana más allá del momento en que sus concentraciones caen por debajo de la concentración inhibitoria mínima.

La TMS tiene efecto post-antibiótico (PAE) in vitro frente a algunos Gram negativos importantes en bovinos y porcinos (*Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Borde-*

tella bronchiseptica y *Actinobacillus pleuropneumoniae*) (28). Se trata de un mecanismo dependiente de la concentración alcanzada. Tilmicosina y tilosina presentan un PAE por 8 horas cuando se logran concentraciones 8 veces la CIM.

Tanto en bovinos como en ovinos y caprinos, luego de la administración subcutánea, la droga se absorbe rápidamente y se distribuye extensamente en todo el organismo. Penetra rápidamente a leche y alcanza concentraciones altas, su elevado volumen de distribución es la prueba más clara de su gran penetrabilidad tisular.

RESIDUOS TISULARES

Los residuos se encuentran primariamente en hígado y riñón y en menor grado en músculo y grasa. Niveles residuales pueden permanecer en la zona de inyección durante un período prolongado; fueron encontrados 2,94 mg/kg a los 28 días post-inyección en bovinos y 1,53 mg/kg a los 14 días post-inyección en ovinos. Estudios de depleción realizados en diferentes especies (ratas, bovinos, ovinos y porcinos) identificaron el compuesto madre como el principal residuo encontrado y también demostraron que éste fue el más persistente en hígado y riñón. En base a estos estudios se recomendó la molécula madre como residuo marcador y el hígado como tejido blanco para los programas de monitoreo, siendo el riñón una alternativa viable con un tiempo de descarte acordado en 28 días para animales productores de carne. La distribución de los residuos difiere entre aves y mamíferos, por lo cual se consideró apropiado recomendar diferentes Límites Máximos de Residuos (MRLs) para aves. Se estableció una Ingesta Diaria Admisible (ADI) de 240 µg/persona. La Agencia Europea para la evaluación de productos medicinales veterinarios (EMEA, 2002) fijó los siguientes MRLs (Tabla 1).

TOXICIDAD

Los antibióticos macrólidos son considerados seguros para su uso clínico, aunque pueden presentar ocasionalmente algunas reacciones adversas (29). Se han documentado efectos adversos de varios macrólidos sobre el sistema cardiovascular (30, 31, 32), pero con dosis muy superiores a las terapéuticas y en sujetos con compromiso cardíaco o con función renal alterada. Tilmicosina puede ejercer una acción tóxica sobre el sistema cardiovascular generalmente debido a la sobredosificación, ocasionando efectos cronotrópicos positivos e inotrópicos negativos. Los casos de toxi-

Tabla 1. Límites máximos de residuos (MRLs) para Tilcomicina establecidos por la Agencia europea para la evaluación de productos medicinales veterinarios (EMEA/MRL/827/02, Final, January 2002. Tilcomisin. Extension to all food producing species).

Table 1. Tilcomisin Maximum Residue Levels (MRLs) established for the Committee for veterinary medicinal products. (EMEA/MRL/827/02, Final, January 2002. Tilcomisin. Extension to all food producing species).

Sustancia farmacológica	Residuo Marcador	Especie Animal	MRLs	Tejido Blanco	Observaciones
Tilmicosina	Tilmicosina	Todas las especies productoras de alimentos, excepto aves	50 µg/kg 50 µg/kg 1000 µg/kg 1000 µg/kg 50 µg/kg	Músculo * Grasa ** Hígado Riñón Leche	
		Aves	75 µg/kg 75 µg/kg 1000 µg/kg 250 µg/kg	Músculo Grasa y piel Hígado Riñón	No utilizar en animales productores de huevos para consumo humano

* Peces: MRL relacionado a músculo y piel

** Porcinos: MRL relacionado a piel y grasa

idad cardiovascular documentada para la tilmicosina corresponden a grandes dosis administradas por vías no aprobadas (33, 34). Los animales jóvenes son considerados particularmente susceptibles a los efectos mencionados y en consecuencia, la molécula no ha sido aprobada para su utilización en corderos de un peso inferior a los 15 kg, ni tampoco debe usarse por vía parenteral en cerdos, equinos, primates ni humanos por su posible toxicidad cardiovascular.

EFICACIA CLÍNICA E INDICACIONES

La tilmicosina presenta actividad in vitro frente a varias bacterias asociadas a la enfermedad respiratoria, tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, y micoplasmas (5, 35, 36). La enfermedad respiratoria porcina asociada con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* ha sido exitosamente controlada con tilmicosina incorporada en la ración de alimento a la dosis de 200-400 mg/Kg (37, 38, 39, 40). Thomson *et al* (41) demostraron que la administración de 400 ppm de TMS en el alimento durante 21 días no produjo efectos tóxicos.

Tilmicosina está indicada en terneros jóvenes para el tratamiento de neumonías a la dosis de 10 mg/kg por la vía subcutánea en dosis única (42). El tratamiento con este antimicrobiano disminuye el número de *Pasteurella haemolytica* en las secreciones nasales, por lo cual el uso profiláctico del mismo antes del transporte o al llegar al feedlot puede reducir

la incidencia de la enfermedad respiratoria aguda en terneros durante el período inicial de llegada, período en el cual los terneros se muestran más susceptibles a las infecciones (43).

Binder (44) demostró que la administración de TMS, en porcinos con neumonía enzootica, a razón de 300 mg/kg de alimento durante 9 días eliminó la presencia de *Pasteurella spp* y *Haemophilus spp*. Mientras que Moore *et al* (40) indicaron que el fosfato de TMS a razón de 200 a 400 mg/Kg de alimento es efectiva para controlar y prevenir la neumonía inducida por *A. pleuropneumoniae* en porcinos, cuando es administrado con el alimento por 21 días. Posteriormente, Paradis *et al* (45), demostraron la efectividad de tilmicosina a razón de 200 g/tonelada de alimento para controlar la pleuroneumonía en porcinos infectados experimentalmente con *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Frente a *Mycoplasma gallisepticum* en pollos se mostró altamente eficaz a una dosis de 50 mg/l de agua de bebida durante 5 días (46).

También está indicada para el tratamiento de mastitis bovina en el período de secado en administración intramamaria a razón de 10 ml (1500 mg) por cuarto. Se comprobó que la infusión intramamaria de tilmicosina produce la cura en un 74,2% de infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus* en el período de secado, siendo comparable con los

resultados obtenidos tras la administración de cefapirina benzatínica (47). Este antibiótico posee ciertas propiedades que pueden combatir las infecciones intramamarias durante el período de secado. Esas propiedades incluyen las interacciones observadas con los fagocitos y células epiteliales bovinas (48, 49). Tilmicosina es rápidamente acumulada en los macrófagos bovinos y en las células del epitelio mamario, esta captación por las células de la glándula mamaria depende de la viabilidad celular, temperatura y pH pero no es influenciada por ningún inhibidor metabólico (26). Hasta el presente, no existen formulaciones intramamarias a base de tilmicosina disponibles.

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una de las enfermedades más difundidas y frecuentes del ganado en nuestro país y a nivel mundial, siendo su agente causal primario *Moraxella bovis*. Algunos factores predisponentes como el alto grado de polvo ambiental, radiación ultravioleta, presencia de moscas e infección con el virus IBR, parecen jugar un rol importante en la transmisión y desarrollo de los brotes de la enfermedad. Esta patología causa importantes pérdidas económicas (50) y debido a su alta incidencia y prevalencia es necesario implementar estrategias de prevención y/o tratamiento terapéutico de los brotes. Para el primer fin se utilizan bacterinas contra *M. bovis* sola o combinada con virus IBR inactivado, cuya efectividad es relativamente baja, debido a la complejidad del proceso etiopatogénico e inmunológico que desencadenan los factores de virulencia del organismo. Para la terapéutica de la enfermedad se utiliza una gran variedad de medicamentos, ya que *M. bovis* es sensible in vitro a muchos antibióticos, pero la especial localización del organismo hace que sólo las drogas que tengan buen acceso al mismo sean efectivas. La tilmicosina (10 mg/kg por la vía subcutánea) ha demostrado ser una droga apta para el tratamiento de la QIB, cuyos resultados superaron a los de la oxitetraciclina (300 mg intrapalpebral), posiblemente por una mayor persistencia en los tejidos oculares que impidieron reinfecciones, ya sea por *M. bovis* o por bacterias de la flora normal que, ocasionalmente, pueden complicar el proceso de cicatrización (51). La característica de la TMS de penetrar los macrófagos y viajar con estos le permite llegar a zonas inaccesibles, como la cámara anterior del ojo, y ejercer su efecto.

El pietín, enfermedad podal de los rumiantes, de distribución mundial y de una

gran importancia económica, es causada fundamentalmente por *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides nodosus*. A estas bacterias se le agregan otras como *Spirochaeta penortha*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Corynebacterium pyogenes*, que agravan las lesiones y afectan las articulaciones del pie y la pezuña. A veces también contaminan las lesiones larvas de *Strongyloides*. Además del tradicional tratamiento local con pediluvios se debe realizar un tratamiento parenteral con antibióticos. Si nos remitimos a lo expuesto en características farmacocinéticas-farmacodinámicas de la tilmicosina, fundamentalmente su penetrabilidad en tejidos periféricos y células; y de acuerdo a su espectro de actividad y baja CIM, nos encontramos frente a un antibiótico de excelencia para el control de esta enfermedad.

CONCLUSIÓN

La tilmicosina es un macrólido con ciertas características que la diferencian de los otros integrantes del grupo. Su capacidad para inducir apoptosis de polimorfonucleares en presencia o ausencia de *P. haemolytica* con capacidad de disminuir el proceso inflamatorio local es esencial. Su habilidad para aumentar la translocación de fosfatidilserina, para inducir la ingestión de PMN por los macrófagos, sumada a sus propiedades antibacterianas complementan la capacidad antes mencionada. Su comportamiento farmacocinético-farmacodinámico (acción antibacteriana concentración dependiente, buena liposolubilidad, elevada distribución tisular, penetración y acantonamiento intracelular), genera la gran ventaja de administrarla en dosis única y la transforma en una herramienta terapéutica de elección para el tratamiento de infecciones bacterianas pulmonares, oculares y podales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crosier KK, Riviere JE, Craigmill AL. eds. Tilmicosin phosphate. In The Food Animal Residue Avoidance Databank. A Comprehensive Compendium of Food Animal Drug. 10th ed, p.386. Publications and Distribution Center, University of Florida, Gainesville, FL. 1996.
2. Mc Kellar QA. Pharmacology and Therapeutics. In Diseases of Sheep, 3rd. Edn. Eds Martín, W.B. & Aitken, L.D. pp. 463-473. Black-Well, Oxford. 2000.
3. Naccari F, Giofre F, Pellegrino M, Calo M, Licata P, Carli S. Effectiveness and Kinetic behavior of Tilmicosin in the Treatment of Respiratory Infections in Sheep. The Veterinary Record 2001; 148: 773-776.

4. Ziv G, Shem-Tov M, Glickman A, Winkler M, Saran A. Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J Vet Pharmacol Therap* 1995; 18: 340-345.
5. Ose EE. *In vitro* antibacterial properties EL-870, a new semisynthetic macrolide antibiotic. *Journal of Antibiotics*. 1987; 40: 190-194.
6. Federal Register, Rules and Regulation (Dec. 27 1996) 21 CFR Parts 556 and 558 – Animal Drugs, Feeds and Related Products; Tilmicosin Phosphate Type A Medical Article. In Federal Register, 61 (250): 68147-68148. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
7. Zielinski GC, Piscitelli HG. Susceptibilidad a los antibióticos de una colección de cepas argentinas de *Moraxella bovis*. Informe Final. Estación Experimental Marcos Juárez, INTA. 1999.
8. Brogden KA, Ackermann MR, Debey BM. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-associated protein induces pulmonary inflammation after bronchoscopic deposition in calves and sheep. *Immun* 1995; 63: 3595-3599.
9. Frank GH. Pasteurellosis of cattle, p. 179-222. In -c. Adlam, and J.M. Rutter (ed.), *Pasteurella* and pasteurellosis. Academic Press Inc., San Diego, Calif. 1989.
10. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, and horses*, p. 747. W.B. Saunders Co. Ltd., London, Great Britain. 1994.
11. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 267-293.
12. Golstein P, Ojcius DM, Young JDE. Cell death mechanisms and the immune system. *Immun Rev* 1991; 121: 29-65.
13. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
14. Fadok V, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; 149: 4029-4035.
15. Savill JS, Wyllie Ah, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1993; 83: 865-875.
16. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 375-380.
17. Chin AC, Lee WD, Murrin KA, Morck DW, Merrill JK, Dick P, Buret AG. Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44 (9): 2465-2470.
18. Lee WD, Flynn AN, LeBlanc JM, Merrill JK, Dick P, Morck DW. Tilmicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and downregulates spontaneous LTB4 synthesis without increasing Fas expression. *Vet Res* 2004; 35 (2): 213-224.
19. Clinkenbeard KD, Clarke C.R, Hague CM, Clinkenbeard P, Srikumaran S, Morton R.J. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced synthesis of eicosanoids by bovine neutrophils *in vitro*. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 644-649.
20. Henricks PAJ, Binkhorst GJ, Drijver AA, Nijkamp FP. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1992; 60: 3238-3243.
21. Morck DW, Merrill JK, Gard MS, Olson ME, Nation PN. Treatment of experimentally induced pneumonic pasteurellosis of young calves with tilmicosin. *Can J Vet Res* 1997; 61: 187-192.
22. Gorham PE, Carroll LH, McAskill JW, Watkins LE, Ose EE, Tonkinson LV, Merrill JK. Tilmicosin as a single injection treatment for respiratory disease of feedlot cattle. *Can Vet J* 1990; 31: 826-829.
23. Morck DW, Merrill JK, Thorlakson BE, Olson ME, Tonkinson LV, Costerton JW. Prophylactic efficacy of tilmicosin for bovine respiratory tract disease. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 273-277.
24. Schumann FJ, Janzen ED, McKinnon JJ. Prophylactic tilmicosin medication of feedlot calves at arrival. *Can Vet J* 1990; 31: 285-288.
25. Hartman EG, Geryl J. Comparison between the minimal inhibitory concentration of tilmicosin and oxytetracycline for bovine pneumonia *Pasteurella haemolytica* isolates. *Vet Q*. 1993; 15: 184.
26. Scorneaux B, Shryock TR. Intracellular accumulation, subcellular distribution, and influx of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells. *J Dairy Sci* 1999; 82 (6): 1202-1212.
27. Modric S, Webb AI, Davidson M. Effect of respiratory tract disease on pharmacokinetics of tilmicosin in rats. *Lab Anim Sci* 1999; 49 (3): 248-253.
28. Diarra MS, Malouin F, Jacques M. Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, and apramycin at subminimal and suprainhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12 (3): 229-237.
29. Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A. Adverse effects of macrolide antibacterials. *Drug Safety* 1993; 9: 346-364.
30. Wakabayashi K, Yamada S. Effects of several macrolide antibiotics on blood pressure of dogs. *Japanese Journal of Pharmacology* 1972; 22, 799-807.
31. Tamargo J, De Miguel B, Tejerina MT. A comparison of josamycin with macrolides and related antibiotics on isolated rat atria. *European Journal of Pharmacology* 1982; 80: 285-293.
32. Freedman RA, Anderson KP, Green LS, Mason

- JW. Effect of erythromycin on ventricular arrhythmias and ventricular repolarization in idiopathic long QT syndrome. *American Journal of Cardiology* 1987; 59: 168-169.
33. Jordan WH, Byrd RA, Cochrane RL, Hanasono GK, Hoyt JA, Main BW, Meyerhoff RD, Sarazan RD. A review of the toxicology of the antibiotic Micotil 300. *Veterinary and Human Toxicology* 1993; 35: 151-158.
34. Main BW, Means JR, Rinkema LE, Smith WC, Sarazan RD. Cardiovascular effects of the macrolide antibiotic tilmicosin, administered alone and in combination with propranolol or dobutamine, in conscious unrestrained dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1996; 19: 225-232.
35. Inamoto T, Dikuchi K, Lijima H, Kawashima Y, Nakai Y, Ogimoto K. Antibacterial activity of tilmicosin against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lesions in swine. *Journal of Veterinary Medical Science* 1994; 56: 917-921.
36. Jordan FTW, Horrocks BK. The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Avian Diseases* 1996; 40: 326-334.
37. Backstrom L, McDonald J, Collins MT, Chung WB, Shryock TR, Ose EE. Efficacy of tilmicosin, and a combination of tylosin and sulfamethazine, for control of swine atrophic rhinitis involving infection with toxigenic type D. *Swine Health Production* 1994; 2: 11-14.
38. Walters J, Brown DR, Tarrant ME. Efficacy of Pulmotil (tilmicosin in premix form) against naturally-occurring pneumonia in growing fattening pigs. In 6th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Abstract O9. Edinburgh, UK. 1994.
39. Moore GM. Efficacy dose determination study of tilmicosin phosphate in feed for control of pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. *American Journal of Veterinary Research* 1996; 57: 220-223.
40. Moore GM, Basson R, Tonkinson LV. Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumoniae caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine. *American Journal of Veterinary Research* 1996; 57: 224-233.
41. Thomson TD, Darby JM, Jordan WH, Tonkinson LV, Blais J, Chamberlain S. Safety of tilmicosin incorporated into swine grower rations. In 6th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Abstract P25. Edinburgh, UK. 1994a.
42. Bishop Y. *The Veterinary Formulary*, 5th ed. The Pharmaceutical Press, London. 2001.
43. Frank GH, Briggs RE, Loan RW, Purdy CW, Zehr ES. Effects of tilmicosin treatment on *Pasteurella haemolytica* organisms in nasal secretion specimens of calves with respiratory tract disease. *Am J Vet Res* 2000; (5): 525-529.
44. Binder S, Le NB, Berner H, Bauer J. The effectiveness of tilmicosin in respiratory diseases of swine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1993; 106 (1): 6-9.
45. Paradis MA, Vessie GH, Merrill JK, Dick CP, Moore C, Charbonnea C, Gottaschalk M, MacInnes JL, Higgins R, Mittal KR, Girard C, Aramir JJ, Wilson JB. Efficacy of Tilmicosin in the Control of Experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in swine. *Can J Vet Res* 2004; 68 (1): 7-11.
46. Kempf I, Reeve-Johnson L, Gesbert F, Guittet M. Efficacy of Tilmicosin in the control of experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis* 1997; 41 (4):802-807.
47. Nickerson SC, Owens WE, Fox LK, Scheifinger CC, Shryock TR, Spike TE. Comparison of tilmicosin and cephalixin as therapeutics for *Staphylococcus aureus* mastitis at dry-off. *J Dairy Sci* 1999; 82 (4): 696-703.
48. Dingwell RT, Duffield TF, Leslie KE, Keefe GP, DesCoteaux L, Kelton DF, Lissemore KD, Schukken YH, Dick P, Bagg R. The Efficacy of Intramammary Tilmicosin at Drying-off, and other Risk Factors for the Prevention of new Intramammary Infections during the Dry Period. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3250-3259.
49. Dingwell RT, Leslie KE, Duffield TF, Schukken YH, DesCoteaux L, Keefe GP, Kelton DF, Lissemore KD, Shewfelt W, Dick P, Bagg R. Efficacy of Intramammary Tilmicosin and Risk Factors for Cure of *Staphylococcus aureus* Infection in the Dry Period. *J Dairy Sci* 2003; 86:159-168.
50. Medrano CA, Suarez VH. Efecto de la queratoconjuntivitis sobre la producción de terneros de destete. *Therios* 1984; 3 (12): 133-139.
51. Zielinski GC, Piscitelli HG, Perez-Monti H. Determinación de la eficacia de distintos niveles de dosificación y vías de administración de tilmicosin (Micotilá) en un brote natural de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. Informe Final. Estación Experimental Marcos Juárez, INTA. 1999.