Cinetica e residui tissutali del tiamfenicolo in galline ovaiole [1]

Marica Romani [2] - Simone Bertini [2] - Mario Giorgi [2] - Marco Bagliacca [3] Grazia Mengozzi [2]

Introduzione

Il tiamfenicolo (TAF) è un antibiotico ampiamente utilizzato in medicina veterinaria nel trattamento di infezioni batteriche, in particolare dell'apparato respiratorio e del tratto intestinale (1, 2, 6). Ha una struttura chimica simile a quella del cloramfenicolo (CAF) da cui si differenzia per la presenza di un gruppo metil solfonico (CH_3SO_2) in sostituzione di un gruppo nitroso (NO_2). Quest'ultimo è ritenuto responsabile della formazione di metaboliti altamente tossici del CAF, che sono causa di soppressione eritropoietica, inibizione della sintesi proteica mitocondriale ed aplasia midollare irreversibile.

Per i suoi effetti collaterali il CAF è pertanto vietato in medicina veterinaria già dalla seconda metà del 1994 sia nei trattamenti individuali che di massa. Il TAF, decisamente meno tossico del CAF (2, 20, 19), ha azione batteriostatica, che diviene battericida a concentrazioni appena superiori a quelle minime inibenti (MIC) la crescita batterica *in vitro* (14, 17, 21). Questo antibiotico svolge la sua azione bloccando la fase finale della sintesi proteica per inibizione dell'enzima peptidiltransferasi impedendo così l'incorporazione degli aminoacidi nella catena polipeptidica in formazione (2, 14, 15, 16).

La somministrazione orale di TAF dà luogo ad un assorbimento quasi completo ma più lento rispetto alla via parenterale e, grazie alla sua scarsa capacità di legame con le proteine e alla sua elevata liposolubilità, diffonde uniformemente nell'organismo (2, 16). La sua attività antibatterica ha un ampio spettro e comprende microrganismi Gram -, Gram +, Anaerobi, Rickettsiae ed alcuni protozoi appartenenti ai generi Treponema ed Entamoeba (3, 5, 9, 21).

Materiali e metodi

Trattamento e raccolta campioni

Gli esperimenti sono stati condotti su 19 galline ovaiole di 470 giorni di età e del peso medio di 1,9 kg, alloggiate in batterie a due piani (dimensione cm 42 × 50 × h 50). Gli animali, che non erano stati debeccati, erano in fase di riposo produttivo (seconda settimana del programma di muta forzata: fotoperoido 8L:16D e alimento a basso contenuto proteico, 10%). Un animale è stato subito sacrificato ed usato per il prelievo di sangue e tessuti da utilizzare come campioni bianchi per la preparazione delle curve standard. Gli altri soggetti sono stati suddivisi in due gruppi (A e B) di 9 galline ciascuno.

Il gruppo A è stato trattato per via endovenosa con una singola dose di 40 mg/kg di TAF glicinato disciolto in soluzione fisiologica; la stessa dose di principio attivo è stata somministrata per via orale sotto forma di capsule al gruppo B. A tutti i soggetti sono stati prelevati 2 cc di sangue con siringhe eparinate dalla vena alare. Per motivi di praticità ciascun gruppo è stato suddiviso in due sottogruppi di 4 e 5 soggetti ai quali sono stati effettuati prelievi alternati a 0,08, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 ore dopo la somministrazione del farmaco per via endovenosa e a 0,25, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 ore dopo la somministrazione del farmaco per via orale. Alla 24ª ora a tutti i soggetti sono stati prelevati campioni di muscolo, fegato, rene, polmone e ovidutto.

Procedimento analitico

L'estrazione del TAF dai campioni di sangue è stata effettuata aggiungendo ad 1 ml di plasma 1 ml di tampone fosfato 0,1 M pH 7 e 4 ml di etilacetato. Dopo agitazione su Vortex e centrifugazione a 2000 giri/min per 15 min, 3 ml di sovranatante sono stati portati a secco sotto flusso di azoto.

Lo stesso procedimento è stato effettuato su 1 grammo di ciascun tessuto utilizzando 3 ml di tampone fosfato e 8 ml di etilacetato. Dopo omogenizzazione e centrifugazione ciascun campione è stato essiccato a 40 °C tramite Rotavapor. Al momento dell'analisi i campioni di plasma e di tessuto sono stati ripresi con 1 ml di fase mobile ed una aliquota di 20 µl iniettata nel cromatografo. Curve standard con plasma e tessuti provenienti dall'animale non trattato sono state preparate aggiungendo quantità scalari da 10 a 0,01 µg/ml e µg/g di TAF. La determinazione quantitativa di TAF è stata effettuata, utilizzando il CAF come "standard interno", mediante un sistema HPLC Jasco con rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 230 nm. La fase mobile costituita da acetato di sodio 0,01M pH 4,3 miscelato con acetonitrile (80:20 v/v) è stata fatta fluire alla velocità di 0,6 ml/min in una colonna C18 Spherisorb ODS2.

---

(1) Questa ricerca è stata condotta con contributo MURST ex 60% 1997.
(2) Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa.
(3) Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi di Pisa.

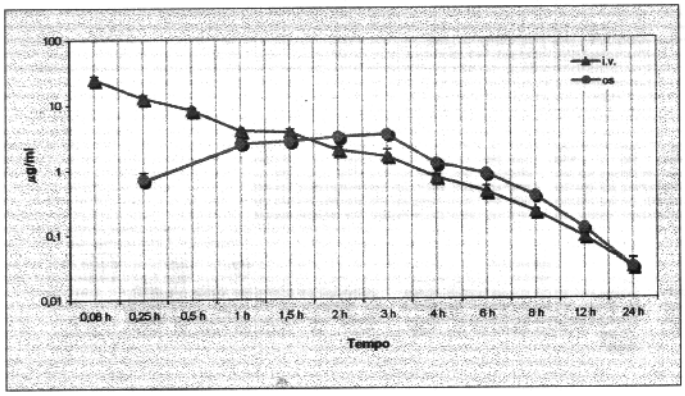

Fig. 1 - Curva concentrazione plasmatica-tempo (media ± ES) del tiamfenicolo somministrato alla dose di 40 mg/kg per via i.v . e orale nelle galline ovaiole

Tab. 1 - Concentrazioni plasmatiche (media ± ES) del tiamfenicolo dopo somministrazione i.v. ed orale (40 mg/kg) nelle galline ovaiole (n = 18)

Ore	Somm. iv		Somm. os	
	M ± E.S.	n	M ± E.S.	n
0,08	24,70 ± 3,49	4		
0,25	12,56 ± 1,61	5	0,71 ± 0,07	4
0,5	8,25 ± 0,69	4		
1	3,98 ± 0,16	5	2,51 ± 0,21	5
1,5	3,72 ± 0,49	4	2,75 ± 0,18	4
2	1,98 ± 0,22	5	3,14 ± 0,33	5
3	1,55 ± 0,47	4	3,38 ± 0,34	4
4	0,73 ± 0,09	5	1,22 ± 0,11	5
6	0,44 ± 0,11	4	0,82 ± 0,15	4
8	0,22 ± 0,01	5	0,37 ± 0,04	5
12	0,09 ± 0,01	4	0,12 ± 0,02	4
24	0,03 ± 0,01	9	0,03 ± 0,01	9

Analisi farmacocinetica

I principali parametri farmacocinetici sono stati calcolati secondo un modello compartimentale aperto (11). Dopo somministrazione i.v. l'andamento cinetico del TAF è stato meglio descritto da un modello bicompartimentale identificato dall'equazione biesponenziale $Cp = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ in cui Cp rappresenta la concentrazione plasmatica al tempo t, mentre A e B rappresentano le intercette al tempo 0 delle rette che individuano la fase di distribuzione α e di eliminazione β. La stima dei coefficienti A e B e degli esponenti α e β è stata effettuata mediante il metodo dei residui e ciascuna osservazione è stata pesata come il quadrato del suo inverso. Dai valori di questi parametri sono poi stati calcolati il tempo di emivita di distribuzione ($T_{1/2\alpha}$) e di eliminazione ($T_{1/2\beta}$), il volume di distribuzione del compartimento centrale (Vd), il volume di distribuzione allo steady state (Vdss) e il volume di distribuzione per area (Vd_β), la clearance totale (Cl) e le costanti di velocità di passaggio dal compartimento centrale al periferico (K_{12}), dal periferico al centrale (K_{21}) e di eliminazione (Kel). Dopo somministrazione orale la farmacocinetica del TAF è stata meglio descritta da un modello monocompartimentale aperto con assorbimento e distribuzione di primo ordine. Dal rapporto tra le aree sotto la curva concentrazione plasmatica-tempo (AUC) determinate mediante la regola dei trapezi, è stata calcolata la biodisponibilità del farmaco dopo trattamento per os. Infine, mediante il principio della sovrapposizione (8), sono state calcolate le concentrazioni plasmatiche del TAF massime, minime e medie, previste allo steady state in seguito a somministrazioni ripetute ogni 6, 12 e 24 ore.

Risultati

Il procedimento di estrazione del tiamfenicolo dal plasma e dai tessuti ha consentito un recupero medio del farmaco di circa il 75% ed il limite di rilevabilità del metodo è risultato pari a 0,01 µg/ml. I valori individuali e medi della concentrazione plasmatica di tiamfenicolo a diversi tempi dopo la somministrazione di 40 mg/kg di farmaco per via i.v. e os ai due gruppi di galline (A e B) sono riportati rispettivamente nella tabella 1. Le curve relative alla concentrazione plasmatica media rispetto al tempo sono rappresentate nella figura 1 ed i parametri farmacocinetici (media ± E.S.) nella tabella 2. Dopo somministrazione i.v. il profilo cinetico del farmaco è stato meglio descritto da un modello bicompartimentale con una rapida fase di distribuzione ($T_{1/2\alpha}$ = 0,75 ± 0,10 h) ed un tempo di eliminazione prolungato ($T_{1/2\beta}$ = 7,86 ± 2,65 h).

I volumi di distribuzione del compartimento centrale, allo steady state e durante la fase di eliminazione sono risultati rispettivamente di 2,63 ± 0,32, 4,87 ± 0,73 e 14,07 ± 2,01 l/kg con costanti K_{12}, K_{21} e Kel di 0,22 ± 0,04, 0,17 ± 0,03 e 0,81 ± 0,10 h^{-1}. Dopo somministrazione orale il tiamfenicolo viene rapidamente assorbito raggiungendo un picco di concentrazione ematica di 3,25 ± 0,23 µg/ml dopo 2,33 ± 0,24 h dal trattamento.

In virtù del suo scarso legame con le proteine plasmatiche e della sua elevata liposolubilità il tiamfenicolo diffonde rapidamente nei tessuti raggiungendo un volume di distribuzione di 9,41 ± 1,82 l/kg. Sulla base di un AUC di 15,85 ± 0,56 µg h/ml la biodisponibilità orale del tiamfenicolo è risultata di circa il 74%.

Nella tabella 3 sono riportati i valori delle concentrazioni plasmatiche massime, medie e minime che, con l'applicazione del principio della sovrapposizione, si può prevedere di raggiungere allo steady state dopo somministrazione orale di capsule contenenti 40 mg/kg di tiamfenicolo ripetuta ogni 6, 12 e 24 h.

Nella tabella 4 si possono osservare infine i risultati delle concentrazioni di tiamfenicolo in alcuni tessuti prelevati alla 24ª h ai due gruppi trattati rispettivamente per via i.v. e os. Tali determinazioni si sono rivelate ripetibili per valori inferiori a 0,02 µg/g ed il rene è risultato l'organo nel quale il tiamfenicolo si concentra maggiormente sia dopo somministrazione i.v. sia orale.

Tab. 2 - Parametri farmacocinetici (media ± ES) del tiamfenicolo dopo somministrazione i.v. ed orale (40 mg/kg) nelle galline ovaiole (n = 18)

Parametri	Somm. orale	Somm. i.v.
AUC (µg h/ml)	15.85 ± 0,56	21,60 ± 1,43
Cmax (µg/ml)	3,25 ± 0,23	
Tmax (h)	2,33 ± 0,24	
Ka (h^{-1})	26.58 ± 5.44	
Kel (h^{-1})	0,22 ± 0,02	0,81 ± 0,10
$T_{1/2}$ (h)	3,36 ± 0,24	
Vd (l/kg)	9.41 ± 1,82	2,63 ± 0,32
Cl (l/kg h)	2,55 ± 0,09	1,90 ± 0,10
C_{24} (µg/ml)	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
F (%)	73,38	
$T_{1/2}$ α (h)		0,75 ± 0,10
$T_{1/2}$ β (h)		7.86 ± 2,65
K_{12} (h-1)		0,22 ± 0,04
K_{21} (h-1)		0,17 ± 0,03
Vdβ (l/kg)		14.07 ± 2,01
Vdss (l/kg)		4.87 ± 0,73

Tab. 3 - Concentrazioni plasmatiche massime, medie e minime (± ES) del tiamfenicolo previste allo steady-state dopo somministrazione orale (40 mg/kg) ripetuta ogni 6, 12 e 24 ore nelle galline ovaiole (n = 18)

Ore / µg/ml	6 ore	12 ore	24 ore
Css max	4,54 ± 0,28	3,52 ± 0,23	3,28 ± 0,25
Css av	2,64 ± 0,94	1,32 ± 0,05	0,66 ± 0,02
Css min	1,04 ± 0,14	0,13 ± 0,03	0,03 ± 0,01

Tab. 4 - Concentrazioni tissutali (media ± ES) di tiamfenicolo (µg/g) somministrato alla dose di 40 µg/kg per i.v. ed orale nelle galline ovaiole

Animali / Tessuti	M ± E.S. i.v.	M ± E.S. *os*
Muscolo	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Fegato	0,59 ± 0,05	0,11 ± 0,01
Rene	1,44 ± 0,32	0,89 ± 0,12
Polmone	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Ovidutto	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01

Conclusioni

L'analisi farmacocinetica dei dati indica la buona biodisponibilità orale del tiamfenicolo nelle galline ovaiole a fine ciclo. L'elevato valore del volume di distribuzione dimostra inoltre che il farmaco si distribuisce bene ai tessuti periferici nei quali può raggiungere concentrazioni superiori a quelle plasmatiche. Tale osservazione è supportata dal fatto che la costante di trasferimento del tiamfenicolo dal compartimento periferico al sangue (K_{21}) è risultata inferiore a quella dal sangue ai tessuti (K_{12}).

Il tempo di emivita più elevato rispetto ad altre specie, quali il bovino (7, 10), l'ovino (1, 13) e il cane (4, 14) indica che nelle galline ovaiole il tiamfenicolo viene eliminato più lentamente e che quindi può mantenere per circa 24 h la sua attività terapeutica nei confronti dei principali patogeni aviari di natura batterica.

Dal calcolo teorico delle concentrazioni plasmatiche ottenibili con somministrazioni orali ripetute ogni 6, 12 e 24 h si può evincere che il trattamento con tiamfenicolo ogni 12 h è in grado di assicurare concentrazioni di farmaco superiori alla MIC di molti batteri tiamfenicolo sensibili.

La determinazione dei livelli di TAF nei tessuti indica il rene come l'organo dove il farmaco si concentra maggiormente a conferma della prevalente eliminazione urinaria di questa molecola (7).

RIASSUNTO

È stata valutata la cinetica e i residui tissutali del tiamfenicolo dopo singola somministrazione per via endovenosa e orale nelle galline ovaiole a fine ciclo di deposizione.

I risultati hanno mostrato una buona biodisponibilità orale del tiamfenicolo nelle galline ovaiole a fine ciclo e concentrazioni superiori a quelle plasmatiche nei tessuti periferici ($K_{21} = 0,17 < K_{12} = 0,22$). Il tempo di emivita, più elevato rispetto ad altre specie (bovino, ovino e cane), indica che nelle galline il tiamfenicolo può mantenere per circa 24 h la sua attività terapeutica nei confronti dei principali patogeni aviari di natura batterica. La maggior concentrazione di tiamfenicolo nel rene rispetto agli altri tessuti esaminati conferma la prevalente eliminazione urinaria di questa molecola.

Parole chiave: tiamfenicolo, farmacocinetica, residui, galline ovaiole.

SUMMARY

THIAMPHENICOL PHARMACOKINETICS AND TISSUE RESIDUES IN MOULTING HENS

Thiamphenicol pharmacokinetics was evaluated in moulting hens (470 days old), after single intravenous and oral administration.

Results showed a good oral bioavailability and higher concentrations in tissues than those in plasma ($K_{21} = 0.17 < K_{12} = 0.22$). Thiamphenicol showed a half life time longer in hens then in other species (such as cow, sheep and dog). Thiamphenicol therapeutic activity can be hold for about 24 hours. Thiamphenicol kidney concentrations confirmed its main renal elimination.

Key words: thiamphenicol, pharmacokinetics, residues, moulting hens.

BIBLIOGRAFIA

1) Abdennebi E.H., Khale N., Sawchuk R.J., Stowe C.M. (1994) - Thiamphenicol pharmacokinetics in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 17: 12-16.
2) Ballarini G. (1996) - Tiamfenicolo: antibiotico su misura. O.D.V. 3: 43-49.
3) Cannon M., Harford S., Davies J. (1990) - A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. J. Antimicrob. Chemother. 26: 307-317.
4) Castells G., Intorre L., Franquello C., Cristofòl C., Perez B., Arboix M. (1997) - Thiamphenicol kinetics in dogs after intravenous and intramuscular administration. J. Vet. Pharmacol. Therap. 20 (suppl. 1): 61.
5) Chen S.C., Wang C. (1993) - In vitro activity of antimicrobial agents against *Nocardia asteroides*. J. Fish Dis.16: 269-272.
6) Evelyn T.P.T. (1968) - Tissue levels of chloramphenicol attained in Sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and Coho (*O. kisutch*) Salmon by feeding. Bull. Off. Int. Epiz. 69: 1453-1463.
7) Gamez A., Perez Y., Marti G., Cristofol C., Arboix M. (1992) - Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves. Br. Vet. J. 148: 535-539.
8) Gibaldi M. & Perrier D. (1982) - Pharmacokinetics. Ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
9) Inamoto T., Takahashi H., Yamamoto K., Nakay Y., Ogimoto K. (1994) - Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. J. Vet. Med. Sci. 56: 393-394.
10) Intorre L., Mengozzi G., Bertini S., Fabbrini M., Secchiari P., Soldani G. (1997) - Farmacocinetica del tiamfenicolo nel vitello preruminante. Atti S. I. S. Vet. 51: 249-250.
11) Istituto Mario Negri, Milano (1992) - Easy-Fit for machintosh.
12) Laplassotte J., Brunaud M. (1961) - Recherches expérimentales sur le thiophénicol activité antibactérienne, concentrations humorales, élimination. Comparaison avec le chloramphénicol. 16: 101-108.
13) Mengozzi G., Bertini S., Intorre L., Belcari B., Soldani G. (1997) - Pharmacokinetics of thiamphenicol after intravenous and oral administration in lambs. J. Vet. Pharmacol. Therap. 20 (suppl. 1): 56.
14) Mengozzi G., Intorre L., Bertini S., Belcari B., Soldani G. (1997) - Cinetica plasmatica del tiamfenicolo nel cane Beagle. Atti S. I. S. Vet. 51: 251-252.
15) Mestorino N., Errecalde J.O., Mariño-Hernández E., Landoni F., Soraci A. (1992) - Concentraciones de tianfenicol en leche tras su administratión intracisternal en vacas. Med. Vet. 9: 181-184.
16) Nau H., Welsch F., Ulbrich B., Bass R., Lange J. (1981) -Thiamphenicol during the first trimester of human pregnancy: placental transfer in vivo, placental uptake in vitro, and inhibition of mitochondral function. Toxicol. Appl. Pharmacol. 60: 131-141.
17) Niro V. (1996) -Attività antibatterica ed aspetti farmacocinetici del tiamfenicolo. O. D. V. 4: 35-40.
18) SAS Institute Inc. SAS® User's Guide: Basics, Version 5 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1985, 1290 pp.
19) Syriopoulou V.P., Harding A.L., Goldmann D.R., Smith A. L. (1981) - In vitro antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 294-297.
20) Yunis A. A. (1988) - Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 28: 83-100.
21) Zanetti G. (1970) - Osservazioni sull'uso del tiamfenicolo in clinica veterinaria. Il Progresso Veterinario 25 (17): 739-744.