

Actividad antibacteriana *in vitro* y biodisponibilidad en vacas de varios preparados de benzilpenicilina G, sola o combinada con sulfato de dihidroestreptomomicina

Luis Ocampo*
David Páez*
Héctor Sumano*
Ana Auró*

Abstract

Producers of benzylpenicillin-G (BP-G) seek competitiveness not only through the actual cost/IU of activity, but also by modifying traditional powder preparations, i.e., as pre-suspended-stable suspensions. Considering the lack of stability of β -lactam antibacterials when suspended, and the different types and proportions of BP-G salts present in a given preparation, noticeable alterations in the *in vitro* activity and bioavailability could occur. To test these hypotheses, 3 powder preparations of BP-G, and 3 identically formulated preparations of pre-suspended BP-G, as well as a procaine-BP-G powder preparation were evaluated to determine their minimal inhibitory concentrations in various bacteria. Bioavailability was also assessed using an agar plate diffusion test to estimate the antibacterial-concentration activity (ACA) of the preparations, maximum plasma ACA ($C_{p_{max}}$), and time to $C_{p_{max}}$ (t_{max}), after one bolus IM dose. Results show that powder preparations of BP-G had greater *in vitro* potency than pre-suspended preparations of this antibacterial. Potency of powder preparations were at least two fold greater than the pre-suspended ones. $C_{p_{max}}$ values were greater when procaine BP-G was used, and minimum with the preparations containing benzathine BP-G. Preparations containing dihydrostreptomycin sulphate showed greater ACA than dihydrostreptomycin-free preparations; however, differences were not statistically significant ($P > 0.05$). This information may be of value to clinicians in particular when efficacy of BP-G against a given disease is borderline. These results question the concept of adding dihydrostreptomycin to BP-G preparations, and ponder procaine BP-G as the penicillin of choice for cattle.

Key words: BENZYLPENICILLIN-G, BIOAVAILABILITY, COWS, STABILITY, DIHYDROSTREPTOMYCIN.

Resumen

Los fabricantes de benzilpenicilina G (BP-IG) buscan competitividad, no sólo mediante el costo/UI de actividad, sino también modificando las presentaciones tradicionales en polvo, generando suspensiones estables, preconstituidas. Considerando la falta de estabilidad de los β -lactámicos cuando se les suspende, así como los diferentes tipos de sales de BP-G presentes en un determinado preparado, se considera relevante realizar estudios comparativos de actividad *in vitro* (concentración mínima inhibitoria) y biodisponibilidad (por difusión en agar) de tres preparados en polvo de BP-G y tres preparados similares pero preconstituidos, así como un preparado de BP-G procaínica en polvo. Para determinar la biodisponibilidad de los preparados mencionados de BP-G se realizaron curvas de concentración-actividad de BP-G versus tiempo y se determinaron las variables de concentración plasmática máxima ($CP_{máx}$) y tiempo para llegar a $CP_{máx}$ ($t_{máx}$), después de una dosis bolo por vía IM. Los resultados muestran que los preparados de BP-G en polvo tuvieron una mayor potencia *in vitro*, al menos el doble de lo observado para los preconstituidos. Los valores de $CP_{máx}$ fueron mayores cuando se utilizó BP-G procaínica y mínimos en los preparados que contenían BP-G benzatínica. Los preparados que contenían sulfato de dihidroestreptomomicina mostraron mayor concentra-

Recibido el 26 de enero de 1999 y aceptado el 16 de junio de 1999.

* Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

ción-actividad antibacteriana que los preparados sin ella. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Se considera que esta información puede ser relevante al clínico, en particular cuando la susceptibilidad de un agente infeccioso a la BP-G está en los límites. Estos resultados cuestionan el valor de agregar dihidroestreptomicina a los preparados de BP-G y ponderan a la BP-G procaínica como la penicilina de elección para el ganado bovino.

Palabras clave: BENZILPENICILINA, SULFATO DE DIHIDROESTREPTOMICINA, GANADO BOVINO, BIODISPONIBILIDAD, ESTABILIDAD.

Introducción

La benzilpenicilina-G (BP-G) fue el primer antibiótico utilizado en vacas, y a pesar de que se le ha usado ya por más de 50 años, sigue siendo el antimicrobiano de elección para muchas enfermedades y representa uno de los mercados más grandes y competidos de la industria farmacéutica veterinaria.¹ Sin embargo, es necesario mantener una actitud crítica para ajustar el uso de los múltiples preparados de BP-G a las enfermedades del ganado. A pesar de su existencia en el mercado veterinario, se le sigue investigando. Por ejemplo, se ha demostrado ahora que las reacciones de aparente hipersensibilidad en el caballo a los preparados de BP-G, son en realidad reacciones de toxicidad al radical procaína de la BP-G-procaínica.² De hecho, se ha estimado que el equino es aproximadamente 20 veces más susceptible a la toxicidad del sistema nervioso central por procaína que el hombre. El ganado bovino es más susceptible que otras especies a presentar reacciones adversas, a menudo fatales, a la carboximetilcelulosa, vehículo de muchas penicilinas preconstituidas (de presentación líquida).³

Es evidente que la extrapolación de datos farmacocinéticos de una especie a otra induce el uso incorrecto de los medicamentos en la especie en estudio.⁴ Un ejemplo que ha persistido en la farmacología es creer que, al igual que en el humano, la BP-G-benzatínica puede ofrecer concentraciones terapéuticas en bovinos, esto es, por arriba de 0.0033 a 0.33 UI/ml de plasma.⁵ En bovinos esto último no sucede, dado que el factor de dilución y la velocidad de absorción del preparado de BP-G benzatínica no logra concentraciones terapéuticas por arriba de lo especificado,^{1,4} situación crítica si se considera que los *Streptococcus* sp son al menos tres veces más

susceptibles *in vitro* que *in vivo*.⁵ Adicionalmente, los preparados con BP-G-benzatínica tienen largos periodos de retiro de rastro y de ordeño.^{6,7} Además de lo señalado, cabe destacar que es sabido que los compuestos β -lactámicos son muy inestables en solución o suspensión acuosa, lo que puede estar sucediendo con los preparados de BP-G sola o combinada con estreptomicina, disponibles en el mercado. Aunque estas presentaciones de penicilina preconstituida han proliferado en el mercado, no se han realizado comparaciones de la potencia *in vitro* que conservan en el producto comercial y, por lo tanto, no se han realizado estudios de bioequivalencia de dichas penicilinas en el bovino. Estos fueron los objetivos del presente ensayo.

Material y métodos

En el Cuadro 1 se detallan las composiciones de las penicilinas comerciales utilizadas, entre las que se incluyen cuatro preparados en polvo* (pBP-G) y tres preparados preconstituidos** (sBP-G). Se compararon las potencias *in vitro* tomando como referencia tres estándares:*** la BP-G-procaínica, la BP-G-benzatínica y el sulfato de dihidroestreptomicina. La potencia de estos estándares fue constatada con la referida por el proveedor mediante el análisis sugerido como estándar,⁺ utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para el sulfato de dihidroestreptomicina y el *Micrococcus luteus* ATCC 9341 para las penicilinas. Las potencias medias calculadas fueron 587 μg de actividad ácida libre/mg de BP-G-procaínica, 700 μg de actividad ácida, libre/mg BP-G-benzatínica y 761 μg de actividad base libre/mg de sulfato de dihidroestreptomicina, valores éstos muy similares a la potencia referida por el proveedor. La actividad antibacteriana de los compuestos comerciales fue evaluada *in vitro* utilizando pruebas de macrodilución para determinar la concentración mínima inhibitorio, en medio de cultivo Müeller-Hinton y utilizando 10 aislamientos de campo para cada una de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium pyogenes* y *Pasteurella* sp. Como soluciones iniciales preparadas en cada ocasión se utilizaron una de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y otra de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de donde se corrieron las

* Proporcionados por Laboratorios Aranda. División, Querétaro, Querétaro, México.

** Obtenidas por compra directa de diversas compañías farmacéuticas de México.

*** Adquiridos en SIGMA-ALDRICH Chemie BV, México.

+ CD-R, Merck & Co., Chapman & Hall EPD, NJ, 1996.

siguientes diluciones dobles: 12.5, 9.37, 6.25, 4.68, 3.12, 2.3, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05. Se incluyeron como testigos dos tubos de ensayo, uno sin el antibacteriano y otro sin bacterias. El tamaño del inóculo se estimó en $1 \cdot 10^{12}$, estandarizado con el nefelómetro de McFarland, utilizando sulfato de bario como referencia a una D.O. de 0.16 a 0.2 a $625 \mu\text{m}$.

Manejo estadístico de los resultados

Las $CP_{\text{máx}}$ obtenidas de 10 vacas por grupo, para cada preparado, se contrastaron por medio de un análisis de varianza para observar si había diferencia estadísticamente significativas entre ellas y posteriormente se realizaron "t" de Dunnet para determinar entre qué preparados se presentaba la diferencia. El límite de confiabilidad utilizado fue $\alpha = 0.05$

La varianza de cada columna fue diferente, por lo que la prueba "t" usada fue para varianzas diferentes con una sola cola.

Para determinar la concentración de las penicilinas en el plasma, no se separó la actividad de la dihidroestreptomicina de la de las BP-G, calificando el

método como cualitativo-cuantitativo, ya que tampoco determina la fracción unida a las proteínas plasmáticas; así el método elegido fue el de difusión en agar de Bennet *et al.*,⁸ realizando una curva de recuperación con únicamente BPG y utilizando una cepa de *Streptococcus agalactie*, en extremo sensible, con plasma de bovino como diluyente. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas y los diámetros de inhibición se expresan en mm, utilizando un Vernier para la medición directa. El límite de detección se estableció por permanencia de la linealidad en la gráfica logaritmo-probabilidad estándar en $0.03 \mu\text{g/ml}$ (0.1667 IU/ml), con una variabilidad intraensayo $< 7\%$ y un rango de precisión interensayos que fluctuó entre 3.5% y 6.8% .

Se utilizaron para cada preparado 10 vacas, pesando a cada animal individualmente. En ellas se aplicó una dosis igual ($20\ 000 \text{ UI/kg}$ IM en el área glútea), basada en las unidades de actividad de BP-G que marcaba cada producto. En el Cuadro 1 se especifican los productos que contenían estreptomycinina y la dosis que les correspondió con base en el peso promedio de las vacas. Se sangraron por punción yugular a cada animal a los siguientes tiempos: 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y

Cuadro 1

COMPOSICIÓN DE LAS BENZILPENICILINAS UTILIZADAS EN ESTE ENSAYO, DOSIS EN ml PARA LOGRAR $20\ 000 \text{ IU/kg}$ Y VALORES DE CONCENTRACIÓN-ACTIVIDAD PLASMÁTICA MÁXIMA ($CP_{\text{máx}}$), Y TIEMPO PARA ESA CONCENTRACIÓN-ACTIVIDAD MÁXIMA ($T_{\text{máx}}$)

Preparado	Composición mg o UI/ml**	UI/ml	Dosis ml/100/kg	$T_{\text{máx}}$ (Horas)	$CP_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/ml}$) $\bar{X} \pm DE$
1p	BPen G proc. 120 000 BPen G Benz. 120 000	240 000	8.33	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.5
1r	BPen G proc. 120 000 BPen G Benz. 120 000	240 000	8.33	1.9 ± 0.4	1.26 ± 0.3
2p	BPen G proc. 200 000 Dihidroestreptomicina 250 mg Flumetazona 0.065 mg	250 000	8.0	2.3 ± 0.4	1.85 ± 0.4
2r	BPen G proc. 200 000 Dihidroestreptomicina 250 mg Flumetazona 0.065 mg	250 000	8.0	2.0 ± 0.5	1.2 ± 0.5
3p	BPen G proc. 150 000 BPen G K 75 000 Dihidroestreptomicina 300 mg	225 000	8.9	2.2 ± 0.3	2.0 ± 0.6
3r	BPen G proc. 150 000 BPen G K 75 000 Dihidroestreptomicina 300 mg	225 000	8.9	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.4
4p	BPen G proc. 180 000	180 000	11.11	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.4

Se tomó la potencia de las penicilinas por mg, de acuerdo con la literatura así: 1 mg de benzilpenicilina potásica = 1557 UI ; 1 mg de benzil-penicilina G procaína = 1000 UI ; 1 mg de benzil-penicilina G benzatínica = 1200 UI .

Cuadro 2
ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE VALORES DE CP_{\max} PARA CADA PREPARADO UTILIZADO

Anova : Factor único

Grupos	Cuentas	Suma	Media	Varianza
1p	10	18	1.8	0.137778
1r	10	12.6	1.26	0.057778
2p	10	18.5	1.85	0.093333
2r	10	12	1.2	0.137778
3p	10	20	2.0	0.191111
3r	10	15	1.5	0.093333
4p	10	23	2.3	0.093333

Anova

Rango de varianza	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de las medias	F calculada	Valor de "P"	F tabulada
Entre grupos	9.660857	6	1.610143	14.01091	4.71E-10	2.246409
Dentro de grupos	7.24	63	0.114921			
Total	16.90086	69				

P = 0.00000000047 \ < 0.05

24 horas. Se centrifugaron las muestras inmediatamente a 3 020 g durante 10 min, se separó el plasma y se le congeló en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización en el bioensayo. Con las concentraciones-actividades encontradas se establecieron perfiles individuales y promedio de concentración-actividad plasmática de BP-G *versus* tiempo. De los perfiles referidos se determinaron las concentraciones plasmáticas máximas (CP_{\max}), el tiempo para llegar a CP_{\max} (t_{\max}), utilizando el software PKAnalyst,* ajustando los datos a un modelo de ingreso y egreso de primer orden.

Resultados

En el Cuadro 1 se muestran las medias ± 1 de los valores de CP_{\max} , y en el Cuadro 2 se muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las CP_{\max} de los 7 preparados t_{\max} obtenidos en cada grupo. El tiempo registrado en el que se logró la extracción de la

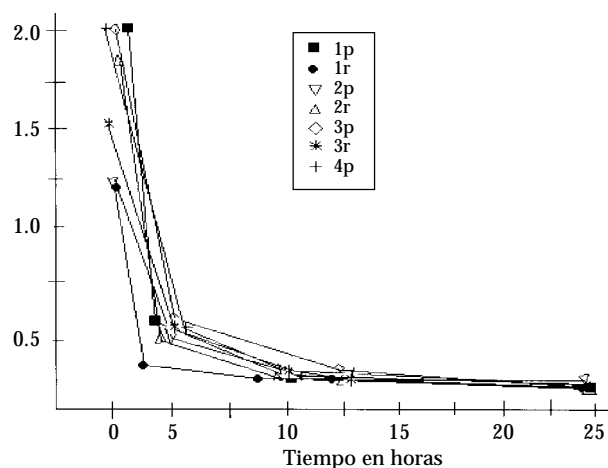


Figura 1. Actividad/concentración plasmática de 7 preparados comerciales de penicilina G, preconstituida o en polvo. Como técnica analítica cuantitativa se utilizó la difusión en agar de Bennett *et al.*⁷ Véase cuadro 1 para la clave de la composición de las penicilinas.

muestra sanguínea no se alejó del establecido más de 1.5 minutos, por ello las gráficas de tiempo *versus* concentración-actividad plasmática están hechas con

* MicroMath Sci. Salt-Lake, Utah, 1995.

Cuadro 3

CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMIS) 50, CMIS 90 Y MEDIA \pm 1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LAS CMI DE VARIOS PREPARADOS DE BENZILPENICILINA-G CON O SIN SULFATO DE DIHIDROESTREPTOMICINA Y DE SUS ESTÁNDARES

Preparados de benzilpenicilina G											
Bacteria	CMI	1p	1r	2p	2r	3p	3r	4p	epP	ebP	eS
<i>Staphylococcus aureus</i>	X \pm	1.18	2.02	1.42	2.02	1.42	2.19	1.86	2.12	1.64	17.97
	DE	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		0.76	1.17	0.63	1.17	0.63	1.00	1.02	0.79	0.30	0.99
	50	0.8	0.8	0.8	1.6	0.8	2.3	2.3	1.6	1.6	12.5
	90	2.3	3.12	2.3	3.12	3.12	3.12	3.12	2.3	2.3	>50
<i>Streptococcus agalactiae</i>	X \pm	1.14	2.32	0.75	2.32	1.14	2.02	2.63	1.08	1.72	7.5
	DE	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		0.81	0.54	0.91	0.53	0.81	0.38	0.45	0.31	0.33	1.4
	50	0.8	0.8	1.6	1.6	2.3	1.6	2.3	1.6	1.6	6.25
	90	1.6	4.68	2.3	3.12	3.12	3.12	4.68	2.3	2.3	12.5
<i>Corynebacterium pyogens</i>	X \pm	0.72	2.94	0.72	2.4	0.72	3.10	3.26	1.16	1.92	18.4
	DE	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		0.93	1.03	0.93	0.72	0.93	0.98	0.86	0.20	0.33	1.18
	50	0.4	1.6	0.4	1.6	0.4	2.3	2.3	0.8	0.8	12.5
	90	1.16	2.3	2.3	3.12	2.3	4.68	4.68	2.3	2.3	>50
<i>Pasteurella spp</i>	X \pm	0.88	1.4	0.88	1.4	0.72	1.56	2.32	1.12	1.0	17.2
	DE	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		0.43	0.82	0.43	1.82	0.17	0.75	0.53	0.22	0.10	1.12
	50	0.4	0.8	0.4	0.8	0.4	2.3	2.3	0.8	0.8	12.5
	90	1.6	2.3	2.3	3.12	2.3	4.68	4.68	2.3	2.3	18.74

* Véase la clave de las penicilinas en el Cuadro 1.

epP: Estándar BP-G procainica.

ebP: Estándar de BP-G benzatínica.

eS: Estándar de sulfato de dihidroestreptomocina.

Cuadro 4

CONTRASTES PAREADOS, ANALIZADOS POR MEDIO DE PRUEBA "t" PARA VARIANZAS DESIGUALES

Grupos	1p	1r	2p	2r	3p	3r	4p
1p							
1r	0.0007						
2p	0.37	0.00004					
2r	0.0009	0.33	0.002				
3p	0.14	0.0005	0.19	0.00016			
3r	0.032	0.033	0.009	0.032	0.004		
4p	0.002	0.00000008	0.002	0.0000006	0.047	0.0000007	

a = 0.05

los tiempos programados. Excepto por un tiempo en el que se detectan diferencias estadísticamente significativas en los valores de Cp_{\max} y t_{\max} ($P < 0.05$ para los grupos 4p versus 3r), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los perfiles farmacocinéticos ya referidos entre los distintos preparados de BP-G. Sin embargo, las vacas que recibieron los preparados de BP-G en polvo mostraron t más cortos y mayores valores de Cp_{\max} , como se muestra en la Figura 1. En el Cuadro 4, contrastan las BPG en polvo de las BPG preconstituidas.

En el Cuadro 3 se detallan los valores medios ± 1 de las CMI obtenidas, así como los valores de MIC_{50} y MIC_{90} de cada una de las bacterias en prueba. La evaluación estadística utilizando análisis de varianza y sucesivas "t" de Dunnet muestra que los preparados en polvo tuvieron valores medios de CMI más bajos que los mostrados por los preparados preconstituidos para *Streptococcus agalactie* y *Corynebacterium pyogenes* ($P > 0.05$). Sin embargo, estas diferencias no se repitieron para *Staphylococcus aureus* ni para *Pasteurella* sp ($P < 0.05$).

Discusión

Es lógico que las compañías farmacéuticas reaccionen a las demandas del mercado y desarrollen nuevas presentaciones de los medicamentos. En el caso de la BP-G, la demanda ha inducido a la proliferación de preparados preconstituidos. Sin embargo, como se deduce de este trabajo, no todos los preparados de BP-G son bioequivalentes, y es posible que esto se deba en buena medida a la degradación del anillo β -lactámico y a los vehículos necesarios para estabilizar a las penicilinas. El desarrollo de nuevos preparados preconstituidos debe considerar no sólo la estabilidad del anillo β -lactámico, se debe constatar la inocuidad de los vehículos. Ya se ha señalado la susceptibilidad de los bovinos a la carboximetil-celulosa,³ vehículo que se agrega en muchos de estos preparados.

Debe cuidarse también que el radical procaína no se libere por exposición de los envases a temperaturas elevadas, lo que sucede más fácilmente en preparados preconstituidos. Esto último puede dar lugar a reacciones adversas.^{1,2,4,9}

En este ensayo se detectó una reducción de la potencia antibacteriana de las penicilinas preconstituidas, con respecto a los preparados en polvo ($P < 0.05$) y aunque no se puede distinguir si la reducción de la actividad fue debido sólo a la BP-G o a la estreptomicina o a ambas, por la estabilidad del aminoglicósido en suspensiones de penicilina, es factible que la reducción se deba a la BP-G y no al sulfato de dihidroestreptomicina.

Se esperaba observar una influencia de la conocida sinergia penicilina-estreptomicina en la potencia

in vitro evaluada. Esto último no se detectó con claridad en este ensayo. Es posible que lo anterior se deba a que la sinergia está documentada contra *Streptococcus* spp,⁵ un hecho que a menudo no se toma en cuenta y se hace extensivo a otras bacterias. Así aunque el preparado de BP-G procaínica sola mostró mayores valores de CMI que los preparados con sulfato de dihidroestreptomicina, las diferencias fueron no significativas ($P > 0.05$).

Considerando los datos obtenidos de las pruebas *in vivo* e *in vitro*, es posible realizar algunas reflexiones. La eficacia clínica de un preparado no puede ser necesariamente correspondiente a la de otro en virtud de las diferencias en bioequivalencia. De acuerdo con los anteriores resultados, no existen bases sólidas para incluir estreptomicina en preparados de BP-G; por ejemplo, si se administra BP-G procaínica sola para el control de *Streptococcus agalactie* y *S. dysgalactie*, se puede esperar una eficacia cercana al 90%^{6,7} y un periodo de eliminación más corto que utilizando preparados de larga duración.⁷ En contraste, la presencia de sulfato de dihidroestreptomicina, difícilmente puede mejorar ese porcentaje dado que no llega a glándula mamaria en concentraciones terapéuticas,⁶ además de que aumenta considerablemente el periodo de retiro, en ocasiones más allá de las cuatro semanas.^{7,10} Por añadidura y como se observó en los valores obtenidos *in vitro*, los valores de las CMI no se reducen sustancialmente versus *Staphylococcus aureus*.

La técnica cuantitativa-cualitativa utilizada no identifica el efecto debido a BP-G y el debido a sulfato de dihidroestreptomicina. Pero esta técnica revela una mala contribución del sulfato de dihidroestreptomicina a la actividad de la BP-G sola. De tal suerte, resulta razonable inferir que la Cp_{\max} más elevada y la t_{\max} más corta observadas para la BP-G-procaínica sola (producto 4p), son resultado de una mayor biodisponibilidad de este preparado en comparación con los preparados que contienen BP-G benzatínica, en particular si están preconstituidas. Así, pues, tomados en conjunto, estos resultados indican que los preparados preconstituidos de BP-G presentan una reducción en su actividad *in vitro* y que su comportamiento *in vivo* arroja valores de CP_{\max} menores a los logrados con preparados en polvo para reconstituir en el momento. Esta diferencia puede tener repercusiones terapéuticas. Adicionalmente, sería recomendable revisar las bases para la inclusión de BP-G-benzatínica y sulfato de dihidroestreptomicina en preparados de BP-G indicados para el tratamiento de infecciones en bovinos, debido a que sus tiempos de retiro son muy prolongados y no parecen mejorar el efecto de la BP-G-procaínica sola. Es posible que la inclusión de estos antimicrobianos a las formulaciones existentes esté más motivada por una percepción de sinergia y no una

evidencia concreta basada en pruebas controladas de desafío clínico.

Referencias

1. Sumano LH. Farmacología clínica en bovinos. México (DF): Trillas, 1995.
2. Chapman CB, Courage P, Nielsen IL, Sitararn BR, Huntington PJ. The role of procaine in adverse reactions to procaine penicillin in horses. *Austr Vet J* 1992;69:29-33.
3. Vomend SK, Sumano LH. Adverse drug reactions and interactions in bovine medicine. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:899-905.
4. Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología veterinaria. 2a ed. México (DF): McGraw Hill/Interamericana, 1997.
5. Goodman L, Gillman A. The pharmacological basis of therapeutics. 4th ed. New York: MacMillan, 1970.
6. Sumano LH, Mateos TG, Brumbaugh GW. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis. *Vet Méx* 1996;27:63-82.
7. Sumano LH, Ocampo CL. Bases farmacológicas de la vigilancia de residuos de fármacos en productos de origen animal. *Vet Méx* 1995;26:175-182.
8. Bennet JB, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM. Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical specimens. Am Soc Microbiol* 1966;14:170-177.
9. Sumano LH, Ocampo CL. Serum and synovial concentrations of penicillin G in horses after two different dose schemes. *Equine Pract* 1993;16:18-21.
10. Sumano LH, Brumbaugh GW. Farmacología clínica de los aminoglicósidos y los aminociclitolos en medicina veterinaria. *Vet Méx* 1995;26:1-15.