

01863



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

VARIACIONES FARMACOCINETICAS DE LA ENROFLOXACINA EN POLLOS DE ENGORDA MEDIANTE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE DOSIFICACION

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTADO POR:

MVZ LILIA GUTIERREZ OLVERA

292629

TUTOR PRINCIPAL: MVZ HECTOR SUMANO LOPEZ

COMITE TUTORAL: MVZ CARLOS LOPEZ COELLO
MVZ FROYLAN IBARRA VELARDE



MEXICO. D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre. A quien nunca olvidare y a quien debo en gran parte lo que soy y mucho de lo que deseo ser. Y gracias a quien amo esta hermosa profesión que me ha llenado de satisfacciones y de experiencias maravillosas.

A mi mami que ha dado la vida por sus hijos, a quien quiero y admiro por el valor que ha tenido ante la adversidad y sobretodo por el cariño que me ha dado.

A mis hermanos Carlos, Eduardo y Areli quienes me han dado su cariño y comprensión incondicionalmente y soportan mis malos ratos, y a mi cuñada Rocio por soportar a mi hermano.

A la memoria de mi abuelita Sabinita que tanta falta me hace.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a cada uno de los profesores que han estado presentes para mi superación académica y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos de toda la vida Pilar, Natalia, Jacqueline, Sonia, Martha, Ivonne, Mary, Yazmin, Claudia y Roberto Isidro con quienes he conocido lo que es la amistad incondicional

A mis grandes amigos del Departamento de Fisiología y Farmacología Luis Carlos, Marisol, Agustin, Norma, Ivan, Dinorah, Mary, Ivonne, Meche, Gaby, leonardo que me han apoyado con su amistad, cariño y muy gratos momento en su compañía. Y en general a todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Dr. Miguel Angel por su amistad y los sabios consejos que me da, aunque sea "duro contra los malvados flojos" y a su adorable familia.

Al Dr. Sumano por toda la paciencia y dedicación que me ha dado, además de brindarme el gran tesoro de su amistad.

*A mis tutores: Dr. Carlos López Coello
Dr. Froylan Ibarra V.
Dr. Hector Sumano L.
por haber sido un gran apoyo en mi formación académica y profesional.*

Al Dr. René Rosiles M. por ser un excelente profesor y un gran amigo.

A la Dr. Raquel López A. por los sabios consejos y recomendaciones y el tiempo que dedicó a la revisión de mi tesis.

Al Dr. Jaime Navarro por la paciencia y toda la desinteresada ayuda para lograr análisis estadísticos confiables y por brindarme su amistad.

Con estimación al Dr. Javier Flores Covarrubias por ser tan gentil y amable, y siempre estar dispuesto a ayudarnos.

Al Dr. Miguel Angel Zamora por todo el apoyo que me ha brindado desinteresadamente y por sus oportunos consejos.

A Mario y Javier del departamento de control de calidad de laboratorios PiSA por dedicarme su tiempo, paciencia y amistad.

A laboratorios PiSA por el apoyo que me brindaron para el financiamiento de la tesis. Es estimulante saber que la industria farmacéutica apoya la investigación básica.

INDICE.

	Pagina
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Mecanismos de acción	5
1.3. Situación actual de la enrofloxacin	7
1.4. Consideraciones farmacológicas	8
2. Hipótesis	12
3. Expectativa empírica	13
4. Objetivos	14
5. Material y métodos	15
5.1. Farmacocinética	15
5.1.1. Dosificación de las aves y obtención de los sueros	15
5.1.2. Procesamiento de los sueros	17
5.1.3. Obtención del estándar para la prueba de Bennet <i>et al</i> (22)	17
5.1.3.1. Preparación del agar	16
5.1.3.2. Cultivo bacteriano	18
5.1.3.3. Preparación de las placas	19
5.1.3.4. Preparación de las diluciones	19
5.1.3.5. Incubación de las placas	21
5.1.4. Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición	22

5.1.5. Procesamiento de los sueros	22
5.1.6. Procesamiento de los resultados	23
5.1.7. Determinación de la pureza de la enrofloxacin	23
5.2. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias	24
5.2.1. Para <i>Escherichia coli</i>	24
5.2.1.1. Obtención del inóculo bacteriano	25
5.2.1.2. Preparación de los tubos de las macrodiluciones	25
5.2.2. Para <i>Campylobacter sp</i>	26
5.2.1.1. Obtención del inóculo bacteriano	27
5.2.1.2. Preparación de los tubos de las macrodiluciones	27
5.3 Análisis estadístico	29
6. Resultados	30
6.1. Farmacocinética	30
6.2. Concentraciones mínimas inhibitorias	33
7. Discusión	33
8. Literatura Citada	43
9. Figuras	48
10. Cuadros	61
11 . Anexos	70

Resumen

Aunque ya se han realizado diversos estudios para definir las variables farmacocinéticas de la enrofloxacin, existen importantes diferencias entre autores. La existencia de estas diferencias indica que se puede manipular la forma de dosificación de la enrofloxacin en aves para lograr ventajas cinéticas. Si se considera adicionalmente, como apreciación empírica, la posibilidad de que exista un aumento en las resistencias bacterianas a enrofloxacin, resulta de interés evaluar si la dosificación estratégica de este antibacteriano podría modificar en algunas variables farmacocinéticas de importancia con lo que se le diera a la enrofloxacin un mejor uso y con ello la posibilidad de una mayor eficacia clínica. Para tal fin se realizó un pequeño escrutinio de la tendencia en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) en dos de los patógenos compartidos entre el hombre y las aves: *Campylobacter sp* y *Escherichia coli*; y se puso a prueba la hipótesis de que la dosificación de enrofloxacin en una concentración dos veces la habitual (0.2%), pero a la misma proporción en miligramos por kilogramo (10 mg/kg), podría elevar los valores de la concentración plasmática máxima ($C_{p_{max}}$) y acortar el tiempo para dicho valor (T_{max}). Más aún se podrían elevar los valores de biodisponibilidad en términos de área bajo la curva (AUC). Para tales fines se llevaron a cabo 47 CMI's para *Campylobacter sp*. y 45 para *Escherichia coli*, provenientes de 92 brotes de campo en 5 estados. Se obtuvo una media de 0.26 ± 0.04 para $MIC_{50\%}$ y de 1.42 ± 0.43 para $MIC_{90\%}$ para *Escherichia coli* y 0.26 ± 0.04 para $MIC_{50\%}$ y de 1.84 ± 0.43 para $MIC_{90\%}$ para *Campylobacter sp*, si consideramos un punto de inflexión de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (para la ciprofloxacina de acuerdo a la NCCLS), se obtuvo un 57.6 % de resistencia para *Campylobacter sp*. y un 53.3 % de resistencias para *Escherichia coli*. Se llevaron a cabo 6 farmacocinéticas de con 240 pollos de engorda (1) la cinética de la enrofloxacin original como punto de

referencia; (2) la cinética de una enrofloxacina clorhidrato en polvo en concentración habitual y al doble de la concentración habitual; (3) la farmacocinética de una enrofloxacina símil en forma habitual y al doble de la habitual y (4) la farmacocinética de una enrofloxacina químicamente equivalente, lo que se demostró mediante la identificación de picos con análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los resultados indican que la hipótesis es verdadera y que los valores de $C_{p_{max}}$ son 426% mayores cuando se administra la enrofloxacina en concentración doble a la habitual en comparación a lo observado cuando se le aplica en concentración habitual. El valor de T_{max} no se modifica sustancialmente y la biodisponibilidad es muy similar entre grupos. Sin embargo se detecta un efecto de metabolismo de primer paso en todos los preparados excepto en el producto original y el equivalente químico. Se concluye que este efecto se debe a los vehículos en un caso y al hecho de ser una sal clorhidrato en el otro, dado que fueron las únicas diferencias. Se modificó de manera importante la vida media de la fase de distribución-eliminación ($T_{1/2\beta}$), lo que modifica sustancialmente los tiempos de retiro calculados entre productos.

1. INTRODUCCION:

1.1. Generalidades

Entre los fármacos más utilizados en la clínica de aves destacan los antimicrobianos. Uno de los grupos más utilizados, además de las tetraciclinas y la mezcla de lincomicina-espectinomicina, es el de las quinolonas y fluoroquinolonas (1).¹

Las quinolonas y fluoroquinolonas son, sin lugar a dudas, uno de los grupos de antimicrobianos más prolíficos de la década de los 80's y 90's (1, 2, 3). A todos los derivados del ácido 4-quinolínico, incluyendo el precursor inicial, el ácido nalidíxico (Figura 1), en Latinoamérica y España se les ha dividido por cuestiones de espectro y comercialización en tres generaciones, de la siguiente manera:

La primera generación inicia con la aparición del ácido nalidíxico y análogos sintéticos como los ácidos pipemídico, piromídico y oxolínico los cuales además de generar resistencia rápidamente no lograra concentraciones antibacterianas sistémicas en el hombre por lo que solamente se les considera útiles como antisépticos urinarios (3, 4, 5).

La segunda generación se distingue por tener un flúor en la posición 6² el cual constituye el avance entre la primera y segunda generación ya que con él se mejora la unión a la ADN-girasa en 2 a 17 veces y la penetración celular de 1 a 70 veces con respecto a las quinolonas que no lo tienen. Entre las quinolonas de segunda generación se pueden

¹ Reporte de mercadeo estadístico, 1998. Sur 127 No 65, Col Minerva, México D.F. 09810.

² Sitio dentro de la molécula en los que es posible añadir algún otro radical para buscar nuevas acciones antibacterianas

mencionar: ciprofloxacina, norfloxacina, flumequina, cinoxacina, tsufloxacina, enoxacina y lifloxacina (3, 4).

El flúor en la posición 6 y un radical 4-metil-piperazín-1-il en la posición 7 distingue a las quinolonas de tercera generación ; con esto se logra el doble de concentración plasmática por comparación sobre los agentes de segunda generación, bajo iguales condiciones experimentales y se aumenta la potencia *in vitro* (1, 3, 4).

De las generaciones descritas, la tercera es la de mayor éxito comercial y terapéutico en medicina veterinaria. En particular, la fluoroquinolona más utilizada en avicultura en todo el mundo, la enrofloxacina (1-3, -ciclo- propil-6-fluoro-1, -dihidro-4 -oxo-7 (4-etil-1-piperazinil)3 - quinolona-ácido-carboxílico)(en inglés: *1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid*) (Figura 2). Este agente es el antimicrobiano más potente conocido a la fecha y se desarrollo a partir de la ciprofloxacina* para su utilización en animales (2, 6). Entre las características más destacadas de la enrofloxacina está el hecho de que actúa por concentración, ejerciendo un rápido efecto bactericida contra Gram negativas aerobias y micoplasmas, incluyendo algunas que son resistentes a otros antimicrobianos y a quinolonas y fluoroquinolonas de primera y segunda generación (7, 8, 9, 10). Como muestra de su notable efecto antibacteriano, en el Cuadro 1 se presentan algunos datos de la literatura con respecto a su actividad antimicrobiana. Cabe destacar de este cuadro, que las sensibilidades asentadas son de bacterias obtenidas a partir de aislamientos en multiples especies domésticas, la información escrita sobre potencia antibacteriana y sobre resistencias en aves,es muy limitada a pesar del uso que se le da a este antimicrobiano (7). Adicionalmente, los datos

* Fármaco de uso exclusivo en humanos, excepto en México

proviene de diversas partes del mundo y no se limita a México o a Latinoamérica.

1.2. Mecanismos de acción

Al igual que las demás fluoroquinolonas, la enrofloxacin inhibe la enzima sintetasa de la ADN-girasa, de lo cual se deriva su gran poder bactericida (4, 6, 7, 10). A diferencia de las quinolonas no fluoradas, la enrofloxacin actúa tanto en la subunidad A, como en la B de la topoisomerasa II. Esta característica le confiere una actividad a la cual las bacterias tienen menos mecanismos de resistencia (3, 1). El mecanismo general como actúan las quinolonas está dado por la interferencia a nivel de las dos cadenas de ADN de doble hélice que deben separarse para permitir su replicación o transcripción. El ADN en reposo se encuentra apilotonado por medio de un enrollamiento positivo de la cadena. Al iniciar la división celular la enzima bacteriana ADN-girasa induce superenrollamientos negativos en el ADN, esto es una reacción ATP dependiente que logra la separación de ambas cadenas de ADN para permitir el pasaje de un segmento de ADN a través de la fractura, el cual es posteriormente liberado. Como ejemplo se podría mencionar que la ADN-girasa de *Escherichia coli* está compuesta de dos subunidades A y dos B. Las subunidades A, que contienen la función de corte de cadenas de girasas, son el sitio de acción de las quinolonas de primera generación, algunas de segunda y la mayoría de las de tercera generación. Pero esta última generación también actúan sobre la subunidad B haciendo más vulnerables la ADN-girasa. De manera simplificada se puede decir que dicho material se encuentra apilotonado y que la función de la ADN-girasa es convertirlo en lineal y girarlo en sentido contrario a la torsión normal de la doble hélice para permitir que el material genético de la bacteria se replique, transcriba, repare y recombine. Así la inhibición de estos procesos bloquea múltiples funciones celulares, muchas de ellas

vitales para las bacterias, de ahí el efecto bactericida de las quinolonas. Además las fluoroquinolonas actúan a dos niveles de la ADN-girasa y se considera que matan a la bacteria por un efecto combinado de inhibición metabólica más la destrucción del material nuclear y aún de la ADN-girasa (3, 4, 6, 7).

En general las quinolonas y en especial las de tercera generación no se inactivan en presencia de suero, actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular (1, 3,11).

La relación existente en la acumulación de quinolonas en las células ha sido un punto de investigación continua. Se ha propuesto que las quinolonas penetran a la célula bacteriana por tres vías: la vía hidrofílica por canales de porinas, la vía hidrofóbica por la membrana fosfolipídica y por concentraciones, las dos primeras rutas involucran la hidrofobicidad y la tercera involucre el desplazamiento de cationes divalentes en la membrana lipopolisacárida de la bacteria (6)

La resistencia a las quinolonas es más rápida que a las fluoroquinolonas; de hecho, se sabe que de manera natural la resistencia a las fluoroquinolonas de tercera generación tiene una frecuencia de mutación inferior a 1×10^{-9} . Aunque experimentalmente se ha logrado seleccionar bacterias resistentes, no se ha descrito la inactivación enzimática de las quinolonas y fluoroquinolonas por bacterias. (3) Se puede añadir que las fluoroquinolonas en lo general y en particular la enrofloxacin, son los antibacterianos que menos resistencias generan (1). No se conocen plásmidos de resistencia para esta fluoroquinolona, pero se postula que pueden seleccionar mutantes resistentes en una pequeña población bacteriana si se les expone a cantidades subterapéuticas. (1, 3)

En algunas especies, quizá incluyendo las aves, la enrofloxacin es biotransformada en parte a ciprofloxacina , esto ha sido tomado como argumento base para el uso de ciprofloxacina en aves, en México. (2, 7, 10,12)

1.3. Situación actual de la enrofloxacin.

Es importante señalar que la enrofloxacin ha sido finalmente aceptada por la FDA para su uso en problemas específcos en la clínica de aves. Esta institució requirió casi dos décadas para permitir su uso en esta especie. Las razones que retardaron esta decisió incluyen el hecho de que las cepas bacterianas resistentes pueden pasar a los consumidores y provocar que los tratamientos con ciprofloxacina en el hombre se vuelvan ineficaces. Se han publicado artículos en los que se menciona que el *Campylobacter sp.* se vuelve resistente después de tan solo una exposició a fluoroquinolonas (13), asimismo, se ha postulado que se han complicado en los tratamientos con fluoroquinolonas en casos graves de diarreas provocadas por *Campylobacter sp* en el hombre(14).

El aumento de cepas resistentes a las fluoroquinolonas coinciden con el aumento del uso de las mismas tanto en medicina veterinaria como en humanos. El uso excesivo de enrofloxacin en la industria avícola y la ruta exclusiva de transmisió de *Campylobacter sp* de las aves al hombre, ha sido el argumento base para explicar que las resistencias encontradas a ciprofloxacina en el hombre se debe a la utilizació de enrofloxacin en la industria avícola. Asimismo, se ha encontrado una resistencia cruzada entre diversas quinolonas incluyendo a la enrofloxacin; (14) evento que se consideraba poco probable dados los mecanismos de acció ya referidos.

En contraste con lo anterior, diversos ensayos realizados con enrofloxacin y ciprofloxacina en pavos revelan que la sensibilidad bacteriana se encuentra inalterada (15), así como también se ha encontrado una baja frecuencia de resistencias de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter lari* en la industria avícola en comparación a estos últimos datos se informa de altos niveles de resistencias de *Campylobacter coli* aislados en cerdos. (16)

Asimismo, se ha estimado que la resistencia a las quinolonas en la industria avícola se encuentran en un rango de 28% para la enrofloxacin y un 50% para el ácido nalidixico (17, 18). En México a pesar del uso intensivo que se le da a la enrofloxacin en la industria avícola no existen datos publicados de las resistencias generadas por la misma o por cualquier otra fluoroquinolona. Por lo anteriormente expuesto es claro que resultaría de interés la comparación epidemiológica entre estos dos escenarios vecinos con un contraste relevante: Estados Unidos de Norteamérica en el cual no se había utilizado la enrofloxacin y por el otro lado México en el cual se ha utilizado y abusado del uso de la enrofloxacin desde 20 años, cabe hacer mención que en Estados Unidos se ha aceptado el uso de enrofloxacin recientemente y bajo muchas restricciones, mientras que en México es el antibacteriano oral para la industria avícola con mayor número de sales genéricas. (19, 20)

Dadas estas diferencias resulta clave evaluar si en México ya se han desarrollado resistencias de *Escherichia coli* a este antibacteriano.

1.4. Consideraciones farmacológicas.

Como se mencionó, la enrofloxacin es uno de los medicamentos de mayor uso en el agua de bebida en la avicultura nacional³, aunque se ha comprobado que su eficiencia puede aumentar al aplicarlo por vía intramuscular. Una práctica común en algunas explotaciones es inyectar al pollo a la recepción para mantener un estado de baja población de Gram negativos en el ave. Esto se logra por la referida eficacia de la enrofloxacin dependiente de la concentración máxima (denominada C_{pmax}) (7, 10). El principal uso que se le ha dado a la enrofloxacin en México y en el mundo de la avicultura es en el tratamiento de infecciones por *Mycoplasma* spp. Principalmente asociadas a *Escherichia coli* en infecciones secundarias respiratorias y colisepticemias, también ha sido considerada como primera opción en términos de eficacia en pasteurelisis (10).

La evaluación de la eficacia de un antibacteriano en campo esta sujeta a múltiples variables, que van desde la percepción de la gravedad de un brote, hasta la denominada redundancia antibacteriana (*overkilling*). Esta situación habia sustentado la negativa de la FDA para aprobar su uso en pollo de engorda, ciertamente de que se ha implicado a la enrofloxacin como causante de la aparición de cepas resistentes de *Campilobacter* spp, que puede afectar al hombre (17,14). Como se menciono anteriormente la situación contraria prevalece en México, país en el que se ha utilizado a la enrofloxacin por mas de una década, a menudo irracionalmente, por subdosificacion o por uso continuo. El resultado de esta práctica “ libre ” de uso ha generado informes de baja eficiencia en toda la república, con lo cual se corre el riesgo de terminar con la vida útil del antibacteriano más potente de la historia de la quimioterapia. Parte de la explicación para la generación de resistencias a

la enrofloxacin es la dosificaci3n poco agresiva y mal dise1ada en t3rminos farmacocin3ticos. Esto es, se dosifica a las aves a un nivel m3nimo, o con una mala estrategia de dosificaci3n generando valores bajos de C_{pmax} y por lo tanto concentraciones tisulares bajas, que a su vez se traducen en menor potencia y permanencia en los sitios de infecci3n, facilitando la aparici3n de mutantes resistentes.

Mediante la determinaci3n y manipulaci3n de variables farmacocin3ticas, como la vida media, biodisponibilidad, T_{max} , C_{pmax} , se pueden modificar las indicaciones de uso de la enrofloxacin y generar esquemas racionales tendientes a evitar la aparici3n de cepas resistentes.(7,21)

En s3ntesis, a pesar de que las fluoroquinolonas modernas tienen una elevada potencia y una baja generaci3n de resistencia bacteriana. El uso indiscriminado que se les ha dado, ha generado finalmente algunas resistencias bacterianas y por ello una disminuci3n en su eficacia cl3nica⁴. Cuando se introdujo inicialmente la enrofloxacin a la medicina veterinaria nacional, las presentaciones utilizadas eran al 5%; en la actualidad el mercado est3 dominado por presentaciones al 10%. Esta estrategia puede haber obedecido a cuestiones mercadot3cnicas⁵, pero quiz3 lleva impl3citas algunas diferencias farmac3uticas, como las que a continuaci3n se exponen:

1.- En los medicamentos que se absorben por transporte activo, la velocidad de absorci3n depende de la concentraci3n.

2.- La absorci3n de un preparado variar3 de acuerdo con los veh3culos (bioequivalencia) y con las sales del producto (solubilidad)

³ Reporte de Mercadeo Estad3stico, 1998. Sur 127 No.65 Col. Minerva, M3xico D.F. 09810

⁴ Comunicaci3n personal de: MVZ Jaime Beltr3n. Pilgrim's Pride San Luis Potos3 MVZ Luis Ocampo Camberos. Jefe del Departamento de Fisiolog3a y Farmacolog3a de la FMVZ, UNAM.

⁵ Reporte de Mercadeo Estad3stico, 1998. Sur 127 No.65 Col.Minerva, M3xico D:F. 09810.

Si existen diferencias farmacocinéticas entre un mismo preparado, pero dosificado a distintas concentraciones, la enrofloxacin puede tener una potencia clínica mayor, con tan solo manipular el sistema de dosificación. Esto adquiere particular relevancia si se toma en cuenta que las fluoroquinolonas actúan más eficientemente cuando logran valores elevados de $C_{p_{max}}$ esto es si la concentración mínima inhibitoria se duplica se obtienen concentraciones óptimas bactericidas, con el consecuente beneficio terapéutico (1). Resulta de valor entonces, estimar si la dosificación de las aves a la misma dosis habitual (10 mg/kg) pero en una solución más concentrada, puede simular de mejor manera el efecto de una dosis “bolo” en campo y generar así $C_{p_{max}}$ superior a la obtenida al proporcionar enrofloxacin a la misma dosis pero en menor concentración; esto es administrada en un mayor volumen.

2. HIPOTESIS:

1.- Es factible obtener $C_{p_{max}}$ mayores en un T_{max} menor, al aumentar la concentración y no la dosis de enrofloxacin en aves medicadas.

2.- Existen diferencias farmacocinéticas en las variables de concentración plasmática máxima ($C_{p_{max}}$), tiempo al que se logra la concentración máxima (T_{max}) y el área bajo la curva (AUC) en diversos preparados farmacéuticos de enrofloxacin.

3. EXPECTATIVA EMPÍRICA:

1.- Los patrones de las concentraciones mínimas inhibitorias para enrofloxacin de la *Escherichia coli* y *Campylobacter spp.*, aislados de campo en México sugieren la posible existencia de resistencias bacterianas.

4. OBJETIVOS:

- Evaluar mediante modelos farmacocinéticos si al aumentar la concentración al doble durante la dosificación de aves, se encuentra una mayor $C_{p_{max}}$ en una T_{max} menor, en comparación a lo observado en la concentración habitual (ambas de 10 mg/kg) .
- Evaluar y comparar las farmacocinéticas de varios preparados farmacéuticos de enrofloxacin.
- Evaluar empíricamente los patrones de concentraciones mínimas inhibitorias de la enrofloxacin para *Escherichia coli* y *Campylobacter sp.* en cepas de campo y determinar en su comportamiento la existencia de resistencias a enrofloxacin comparandolos con datos reportados internacionalmente.

5. MATERIAL Y METODOS:

5.1 Farmacocinética:

5.1.1 Dosificación y obtención de los sueros

La fase experimental de campo se realizó en las instalaciones de la Granja Veracruz de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se utilizaron 240 aves machos de la raza Arbor- Acres, con un peso promedio de 750 g, de 3 semanas de edad, clínicamente sanos, a los cuales se les confirmó no-medicación antibacteriana previa al inicio del experimento.

Las aves fueron inmunizadas conforme a las practicas habituales del manejo de la granja.

GRUPO 1.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en 4 grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una concentración de 0.1 mg/ml del producto 1⁶.

GRUPO 2.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en 4 grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico

⁶ Piroflox 20% solución concentrada®. PiSA agropecuaria S.A. de C.V.

individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una dosis de 0.2 mg/ml del producto 1⁷.

GRUPO 3.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en 4 grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una dosis de 0.2 mg/ml del producto 2⁸.

GRUPO 4.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en 4 grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una dosis de 0.1 mg/ml del producto 3⁹.

GRUPO 5.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en 4 grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una dosis de 0.2 mg/ml del producto 3⁹.

GRUPO 6.- Constó de 40 aves seleccionadas aleatoriamente, un día previo a la dosificación se pesaron y marcaron individualmente, separándolas en grupos de 10 aves cada uno. Se les dosifico individualmente por medio de una sonda a razón de 10 mg/kg a partir de una solución con una dosis de 0.1 mg/ml del producto 4¹⁰

⁷ Piroflox 20% solución concentrada ®. PiSA agropecuaria S.A

⁸ Piroflox 5% solución concentrada ®. PiSA agropecuaria S.A. de C.V.

⁹ Piroflox 50% polvo soluble ®. PiSA agropecuaria S.A de C.V.

¹⁰ Baytril® Bayer. México.

Se tomo individualmente el tiempo de dosificación de cada ave, los subgrupos en los cuales se dividió cada grupo constituyeron cada uno de los tiempos de sangrado, dividiéndose así en :25 minutos, 45 minutos, 1.5 horas, 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas y 24 horas. Cada ave fue sangrada al tiempo que correspondía a su hora de muestreo con exactitud y diferencia de 1 minuto. Se obtuvieron aproximadamente 2 ml de sangre por ave, la cual se sometió a centrifugado durante 10 minutos para la obtención del suero, el cual fue colocado en frascos con tapón de rosca de 1ml, identificados cada uno de ellos con el grupo al que pertenecía, el tiempo de sangrado y el número de ave sangrada, se mantuvieron en una hielera para posteriormente ser congelados (-4°C) hasta su análisis.

5.1.2. Procesamiento de los sueros.

La fase de laboratorio se realizó en el área de Control de Calidad dentro de las instalaciones de Laboratorios PiSA, mediante el método microbiológico de Bennet et al. (22) que según Kung et al. (23) es tan sensible como el uso de HPLC.

5.1.3 Obtención del estándar para las pruebas de Bennet et al (22).

5.1.3.1 Preparación del agar:

- El agar utilizado fue MacConkey (Bioxon)¹¹ preparado a razón de 50 g/l, su método de preparación se describe a continuación:
 - Pesar el medio deshidratado (50g) en una balanza analítica, una vez obtenida la cantidad deseada, se coloca en un matraz y se afora con agua destilada a 1 litro. Se agita hasta obtener una mezcla uniforme.
 - Dejar reposar de 10 a 15 minutos.

¹¹ Becton Dickinson de México, SA de CV.

- Poner a calentar en la plancha agitando frecuentemente esperar a que comience a hervir la mezcla, sin dejar de agitar, dejar calentar un minuto para posteriormente quitar de la estufa
- El agar se deja enfriar un poco (que no comience a gelatinizarse), para posteriormente ser colocado en frascos con tapón de rosca de 200 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos 15 lb de presión, conforme se va necesitando el agar se mete a licuar (en la autoclave a 121 °C durante 10 minutos 15 lb de presión).

5.1.3.2. Cultivo bacteriano:

- Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Escherichia coli*.
- Colocar 1 asada del cultivo de *Escherichia coli* en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 5 ml de agua desionizada.
- Por medio de los estándares de Mc Farland¹² realizar los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland.

Principio de los estándares: la densidad de una suspensión microbiana es comparada con una ampolla de turbidez conocida y que tiene el mismo diámetro, los pasos a seguir son los siguientes:

- Tomar el patrón elegido (0.5).
- Preparar suspensión bacteriana en ampolla de igual diámetro.
- Homogeneizar bien.
- Agitar fuertemente la ampolleta patrón

¹² BioMérieux

- Comparar la turbidez colocando las ampolletas (patrón al 0.5 de Mc Farland y tubo con cultivo bacteriano de *Escherichia coli*) delante de un fondo negro.
- Ajustar la suspensión bacteriana hasta que tenga la misma turbidez del patrón, agitar nuevamente el patrón antes de proceder a una nueva comparación.

5.1.3.3. Preparación de las placas:

- Un día previo a su utilización esterilizar los refractarios cuadrados (pyrex 21 X 20 cm) junto con los tubos de ensayo para las diluciones y para la preparación del cultivo bacteriano.
- Licuar el agar y colocarlo en los refractarios 200 ml del agar por refractario.
- Dejar enfriar el agar durante 10 minutos
- Realizar la siembra, con isopo estéril, colocar en el centro de la placa 200 µl de la suspensión con la bacteria (tratando de quedar distribuido de forma homogénea)

5.1.3.4. Preparación de las diluciones :

- Pesar 20 mg del estándar de enrofloxacin pura (99 %).
- Colocar 100 ml de agua desionizada en un matraz volumétrico de 100 ml y disolver en él los 20 mg de enrofloxacin (para que se disuelva es necesario agregar 0.5 ml de una solución de NaOH al 5 %, previo a la adición del agua desionizada).

- Marcar 10 tubos de 10 ml numerándolos del 1 al 10, adicionar a cada uno de ellos 1 ml de agua destilada, a un tubo de 15 ml se le numera con el 0 y se le agregan 9 ml de agua destilada.
- Del matraz se toma 1 ml y se agrega al tubo marcado con el número 0, se agita y de este se toma 1 ml y se agrega al tubo marcado como 1, se agita y de este se toma 1 ml y se agrega al matraz marcado con el número 2 y así sucesivamente hasta tener las 10 diluciones.

Teniéndose finalmente las siguientes concentraciones por tubo.

Tubo número	Concentración
Matraz	200 µg/ml
Tubo 0	20 µg/ml
Tubo 1	10 µg/ml
Tubo 2	5 µg/ml
Tubo 3	2.5 µg/ml
Tubo 4	1.25 µg/ml
Tubo 5	0.625 µg/ml
Tubo 6	0.3125 µg/ml
Tubo 7	0.15625 µg/ml
Tubo 8	0.078125 µg/ml
Tubo 9	0.0390625 µg/ml
Tubo 10	0.01953125µg/ml

5.1.3.5. Incubación de la placa

- Una vez preparado el cultivo bacteriano estandarizado y preparada la placa, se le divide en dos (por la parte inferior con un marcador indeleble) y a cada lado se realizan 10 pozos por medio de un sacabocados
- Se marca por la parte inferior de la placa con plumines indelebles a cada pozo, numerándolos de el 1 al 10, en cada pozo se colocan 100 μ l de cada uno de los tubos los cuales tienen que corresponder en número tubo:pozo.
- Para tener finalmente un pozo con cada una de las diluciones, iniciando en forma decreciente (10 μ g/ml a 0.01953625 μ g/ml).
- En la otra mitad de la placa realizar exactamente lo mismo, tomándose esta como la repetición.
- Tapar la placa con papel filtro estéril (para evitar que la condensación del agua moje el cultivo e impida la lectura de los halos de inhibición) y sobre este colocar papel aluminio.
- Incubar durante 24 horas a 37 °C.
- Transcurridas las 24 horas realizar la lectura de los halos de inhibición con ayuda de un Bernier digital, se anotan los milímetros de halo de cada una de las diluciones y de su repetición.
- Este procedimiento se repite 4 ocasiones más, para tener finalmente 10 procesamientos cada una de las diluciones.

5.1.4. Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición.

- Se obtienen los promedios y desviación estándar del diámetro del halo de inhibición de cada una de las diluciones.
- Con estos datos y con ayuda de los programas Microcal Origin¹³ y Excel¹⁴ se obtiene una gráfica en milímetros de halo de inhibición *vs* concentración.

5.1.5. Procesamiento de los sueros.

- Se preparan las placas con la misma concentración bacteriana y del mismo modo en que se prepararon las placas para obtener el estándar mediante las pruebas de Bennet *et al* (22).
- Cada placa se dividió en dos y se marcó inferiormente con plumines indelebles a que grupo de muestra correspondía (de la 1 a la 6).
- En cada división se hicieron 20 pozos, y se marcaron a que número de ave corresponde cada uno de ellos.
- De los 20 pozos 10 correspondían a cada una de las aves y los otros diez correspondieron a su repetición.
- Por cada pozo se colocaban 100µl de suero .
- Las placas se metían al horno durante 24 horas, pasadas las cuales se realizaba la medición del diámetro de cada uno de los halos de inhibición obtenidos, registrándose los datos.

¹³ Microcal origin version 4.0. Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.

¹⁴ Microsoft Excel. 1985-97

- Este procedimiento se repitió para cada uno de los grupos y las 8 lecturas realizadas en cada uno de ellos.

5.1.6. Procesamiento de los resultados:

- De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar en mm de halos de inhibición y por extrapolación a la figura 3, en la que se presenta el estándar de referencia de enrofloxacin se obtienen los $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las muestras.
- Posteriormente los resultados expresados en $\mu\text{g/ml}$ se procesaron en el programa PKAnalyst¹⁵, en donde se obtuvieron las gráficas de concentración vs tiempo y el cual proporcionó los datos farmacocinéticos y estadísticos para cada uno de los productos utilizados.
- Dados los modelos proporcionados por este programa se encontró que los mayores valores de confiabilidad ($r = 0.90$) se encontraron al aplicar los modelos 3 y 5 (ver anexo 1 y 2).

5.1.7. Determinación de la pureza de la enrofloxacin utilizada:

Para evitar errores inherentes a la identidad y concentración de las enrofloxacinas contenidas en las presentaciones utilizadas se realizaron cromatogramas de cada una de las presentaciones, las pruebas fueron realizadas en laboratorios PiSA S.A de C.V. en Guadalajara.

En el anexo 3 se presenta un cromatograma tipo y se detallan las concentraciones de enrofloxacin y ciprofloxacina de cada muestra.

5.2. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

5.2.1. Para *Escherichia coli*.

Se realizaron cultivos bacterianos de cepas de *Escherichia coli* de campo las cuales fueron sometidas a pruebas de concentraciones mínimas inhibitorias con diversas concentraciones de enrofloxacin.

Las cepas fueron obtenidas directamente de campo, las cuales fueron donadas por los siguientes laboratorios: Laboratorios PiSA, Laboratorios Aranda y Laboratorios Vrot, anotandose el lugar de procedencias de cada uno de los aislamientos.

La *Escherichia Coli*, como la mayoría de las enterobacterias no son exigentes en sus requerimientos nutricionales. Para su aislamiento se requiere generalmente de medios de cultivo selectivos y diferenciales.

En este caso el medio de cultivo utilizado fue: Muller-Hinton¹⁶.

A fin de determinar la potencia antibacteriana de la enrofloxacin ante diversas cepas de campo de *Escherichia coli* y cepas ATCC de la misma bacteria (estándares de referencia), se llevaron a cabo la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macro-dilución en tubo.

¹⁵ Micro Math PKAnalyst. Scientific Software.

¹⁶ Becton Dickinson de México, SA de CV.

La determinación de las CMI's para las bacterias se realizaron utilizando pruebas de macrodilución en tubo basándonos en la metodología planteada por la NCCLS¹⁷.

5.2.1.1. Obtención del inóculo bacteriano.

Para la obtención del inóculo de la bacteria se realiza el mismo procedimiento que se utilizó en las pruebas de Bennet *et. al* (22) diluyendo una hasada de la muestra de la bacteria en agua desionizada y ajustándola a 0.5 de Mc Farland.

5.2.1.2 Preparación de los tubos de las macrodiluciones.

Para la preparación de los tubos en los cuales se realizan las macrodiluciones es necesario preparar caldo nutritivo¹⁸

De la misma manera que en la cinética, se prepara el stock de enrofloxacin (20 µg/ml). Se va a tener un tubo para cada una de las diluciones de enrofloxacin y cada uno de ellas debe contener además de 1ml de la dilución correspondiente de enrofloxacin, 5 ml de caldo nutritivo y 1 ml de la suspensión de la bacteria, además de tener un tubo control de la bacteria (solo contiene el caldo nutritivo y 1 ml de la suspensión de bacteria) y un tubo control sin bacteria (solo contiene el caldo nutritivo). Una vez que se tiene todo esto en los tubos se meten a incubar durante 18 a 24 horas para posteriormente hacer la lectura. Para realizar las lecturas de crecimiento bacteriano se requiere añadir 1 ml de una solución de formaldehído al 0.5% a cada uno de los tubos incluyendo los controles para detener el crecimiento bacteriano, posteriormente con la ayuda de un fotocolorímetro se realizan las lecturas en las cuales se

¹⁷ Janury 1996. ISBN 1-56238-292-6. Order Code SC3-L

¹⁸ Caldo Nutritivo. Bioxon®. Cat 103-1. Peptona de gelatina 5.0 g. Extracto de carne de res 3.0 g..

tubos control contra los experimentales y se registra hasta el mínimo crecimiento bacteriano. Las diluciones utilizadas de enrofloxacin fueron 5, 3.75, 2.5, 1.875, 1.25, 0.9375, 0.625, 0.46875, 0.3125, 0.234375, 0.15625, 0.1171875, 0.78125, 0.05915625, 0.390625 µg/ml. Se registraron las CMI's para cada una de las muestras.

5.2.2. Para *Campylobacter spp*:

Para el aislamiento e identificación de las diversas campilobacteriosis, se requieren medios selectivos y la incubación debe efectuarse en una atmósfera con reducción de O₂ (5% de O₂) en CO₂ (10% de CO₂). Una manera relativamente sencilla de producir la atmósfera de incubación consiste en colocar las placas en un ambiente de anaerobiosis sin el catalizador, y de producir el gas con un paquete generador del mismo. La incubación de las placas primarias se efectuó una temperatura de 42 a-43°C . Aunque *C. Jejuni* crece bien a temperaturas de 36 a 37 °C, la incubación a mayor temperatura impide el crecimiento de una gran variedad de bacterias que también se encuentran en las heces.

Las colonias obtenidas en el medio de cultivo fueron características, esto es: tienden a ser incoloras o grises, ser acuosas y extenderse o ser redondas y convexas, y en algunos casos ambos tipos de colonias fueron encontradas en las placas de agar (24, 25, 26).

La determinación de las CMI's para las bacterias se realizaron utilizando pruebas de macrodilución en tubo basándonos en la metodología planteada por la NCCLS¹⁹.

5.2.2.1. Obtención del inóculo bacteriano.

Para la obtención del inóculo de la bacteria se realiza el mismo procedimiento que se requiere en las pruebas de Bennet *et al.*(22) diluyendo una muestra de la bacteria en agua desionizada y ajustándola a 0.5 de Mc Farland.

5.2.2.2 Preparación de los tubos de las macrodiluciones.

Para la preparación de los tubos en los cuales se realizan las macrodiluciones es necesario preparar Campylobacter Agar Base²⁰ y el estándar de *Campylobacter sp* tal y como se estandariza en la prueba de Bennet *et al.* antes mencionada.

De la misma manera en que se trabaja con la prueba de Bennet *et al* (22) se prepara el “stock” de enrofloxacin (20 µg/ml). Se va a tener un tubo para cada una de las diluciones de enrofloxacin y cada uno de ellas debe contener además de 1ml de la dilucion correspondiente de enrofloxacin, 5 ml de caldo nutritivo²¹ y 1 ml de la suspensión de la bacteria, además se debe tener un tubo control de la bacteria (solo contiene el caldo nutritivo y 1 ml de la suspensión de bacteria) y un tubo control sin bacteria (solo contiene el caldo nutritivo).

Una vez que se tiene todo lo anterior en los tubos se meten a incubar durante 18 a 24 horas para posteriormente hacer la lectura, la incubadora se regula para tener un medio que proporcione anaerobiosis para el crecimiento de la bacteria una atmósfera con reducción de O₂ (5% de O₂)

¹⁹ Janury 1996. ISBN 1-56238-292-6. Order Code SC3-L

²⁰ Campylobacter Agar Base®. DIFCO. 1820-07-9

²¹ Bioxon.- Becton Dickinson de México SA de CV

en CO₂ (10% de CO₂). Para realizar las lecturas de crecimiento bacteriano se requiere añadir 1 ml de una solución de formaldehído al 0.5% a cada uno de los tubos incluyendo los controles para detener el crecimiento bacteriano, posteriormente con la ayuda de un fotocolorímetro en el cual se comparan los tubos control contra los experimentales y se registra hasta el mínimo de crecimiento bacteriano.

Las diluciones utilizadas de enrofloxacin fueron 5, 3.75, 2.5, 1.875, 1.25, 0.9375, 0.625, 0.46875, 0.3125, 0.234375, 0.15625, 0.1171875, 0.078125, 0.05915625, 0.0390625 µg/ml. Se registraron las CMI's para cada una de las muestras procesadas.

5.3. Análisis estadístico :

Para los CIM's se utilizaro estadística descriptiva (media, mediana y moda).

Para los datos farmacocinéticos se utilizo un modelo de 3 factores fijos con 5 repeticiones y sus interacciones . Utilizando la siguiente fórmula estadística :

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + P_j + T_k + (D \cdot P)_{ij} + (D \cdot T)_{ik} + (P \cdot T)_{jk} + (D \cdot P \cdot T)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde :

Y_{ijkl} = respuesta de la i -ésima dosis al j -ésimo producto al k -ésimo tiempo en la l -ésima repetición.

M = media general.

D_i = efecto de la dosis.

P_j = efecto del producto.

T_k = efecto del tiempo de sangrado.

E_{ijkl} = error aleatorio $\sim N(\sigma, \sigma^2)$.

Los datos obtenidos fueron procesados en los programas, JMP²² y Primer of biostatistic²³.

²² JMP © SAS Institute . Version 3.1.6.2.

²³ Primer of Biostatistic 1992 Mc Graw Hill. 1992. Version 3.02.

6. RESULTADOS:

6.1. Farmacocinética:

En total se llevaron a cabo 6 estudios farmacocinéticos en 4 productos comerciales utilizados, ya sea a concentración habitual usada en granjas (1g/l) o a una concentración del doble (2g/l). Para esto se utilizaron 240 aves con un peso entre 0.510 y 1.20 kg con un promedio global de 0.771 ± 0.101 kg.

A las aves se les pesó individualmente y se les dosificó mediante una sonda rígida de manera tal que se calcula un error mínimo en la relación mg/kg (Anexo 4). Cada ave fue sangrada dos veces procurando un intervalo entre el primer y segundo sangrado, lo más distante posible.

Dada la cantidad de aves sangradas por tiempo predeterminado se requirió y contó con la asistencia de 4 técnicos y se calculó que la diferencia entre el primer y último sangrado por grupo no fue mayor a 3 minutos; esto es un 15% del intervalo más corto entre sangrados, que fue de 20 minutos al inicio del muestreo. Este mismo valor es infinitamente más pequeño para el intervalo más grande (0.41%).

La estandarización de la curva de Bennet *et al* (22) que relaciona concentración actividad vs mm/halo de inhibición se presenta en la Figura 3 y deriva de los datos en el Cuadro 2. La regresión lineal en dicha figura tiene una confiabilidad del 99%. Para obtener dicha confiabilidad y para la validación de la técnica analítica se utilizó un modelo de regresión lineal por un método cuadrático (ver Anexo 5) según lo marcan las normas de la

FDA para la validación de procedimientos analíticos* (ver Anexo 6). Los límites de esta curva se establecieron en 10 µg/ml en lo superior y llegaron a 0.31 µg/ml en lo inferior.

Para la corroboración de la confiabilidad de el método se realizaron ensayos agregando muestras conocidas de enrofloxacin a sueros obtenidos de aves no medicadas. En todos los casos se obtuvieron porcentajes de recuperación que fluctuaron en torno a una media de 99.64 ± 0.974 . Estos ensayos se presentan en el Cuadro 3.

En el Cuadro 4 se presentan las concentraciones séricas obtenidas para las replicas en cada una de las farmacocinéticas realizadas, en dicho cuadro se presentan los valores promedios en microgramos por mililitro derivados de la extrapolación de los milímetros de halos de inhibición a los valores de concentración en la curva patrón ya mencionada .

En la Figura 4 se presentan las comparaciones de concentraciones séricas de enrofloxacin entre los grupos 1 y 2 y en la Figura 5 entre los grupos 4 y 5, en las que se puede observar el aumento en las concentraciones séricas de enrofloxacin en los grupos en los cuales se dosifico al doble de concentración (grupos 2 y 5) contra los grupos dosificados con la dosis utilizada comercialmente (grupos 1 y 4).

En la Figura 6 se presentan las curvas comparativas entre los grupos 2, 3 y 5 (dosis de 0.2 g/ml) y en la Figura 7 las curvas comparativas entre los grupos 1, 4 y 6 (dosis de 0.1 g/ml), con lo cual se puede ver que siendo el mismo principio activo se cuenta con diversas biodisponibilidades.

* <http://www.fda.gov/cum/fda/infores/guidelines/guida64.pdf>.

Estos datos fueron analizados utilizando el paquete computacional PKAnalyst, posterior al análisis de los diversos modelos, se eligió el modelo cinético que proporcionara una mejor confiabilidad estadística a los resultados obtenidos ($R \geq 0.9$), que en este caso fueron los modelos 3 y 5, si los datos de las concentraciones plasmáticas se unen entre sí por líneas rectas en todos los casos, se presenta una caída drástica entre 0.75 y 1.5 horas y las concentraciones regresan a los niveles esperados a las 3 horas. Estas variaciones se pueden observar en las Figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13 Este fenómeno no se detecta en dos de las presentaciones, el fármaco utilizado como original enrofloxacin al 5% (grupo 6)¹ y una sal de clorhidrato de enrofloxacin en presentacion al 20%².

En la Figura 14 se muestra gráficamente que los valores obtenidos de la prueba de Bennet *et al* (22) por grupo y entre los grupos no son estadísticamente significativos ($P > 0.05$) entre si, a excepción de el grupo 5 ($P < 0.05$) el cual si es significativamente diferente a los otros 5 grupos, pero este análisis solamente se refiere a los valores de concentraciones plasmáticas sin tomar en cuenta el tiempo de muestreo. Apoyándonos en los programas antes mencionados se obtuvieron los valores comparativos cinéticos de los 6 grupos, tales resultados se encuentran contenidos en el Cuadro 5. Tomando en cuenta los valores antes mencionados se puede decir que, los resultados obtenidos son estadísticamente significativos, encontrándose una $P = 0.0001$ en la comparación entre grupos vease Cuadro 6.

¹ Bayer, de México SA de CV. Y una sal de clorhidrato de enrofloxacona

² Piroflox 5% solución concentrada®. PiSA agropecuaria S.A. de C.V.

6.2. Concentraciones mínimas inhibitorias.

Los resultados obtenidos de las resistencias bacterianas a enrofloxacin en diversos estados de la República Mexicana se encuentran en el Cuadro 7. Tomando como punto de inflexión 0.5 µg/ml (para la ciprofloxacina de acuerdo a la NCCLS), se obtuvo un 57.6 % de resistencia para *Campylobacter sp.* y un 53.3 % de resistencias para *Escherichia coli.*

7. DISCUSIÓN:

Durante la fase de sangrado se trataron de mantener las condiciones óptimas y la mayor precisión posible, tanto en la dosificación como en la toma de muestras. Dada la velocidad que es requerida para realizar las maniobras fue necesaria la ayuda técnica de 4 personas y un coordinador, anotando los tiempos exactos de sangrado con respecto al instante de la dosificación. Adicionalmente al terminar la administración de enrofloxacin algunas aves llegaron a regurgitar parte del medicamento depositado directamente en el proventrículo, estos animales fueron eliminados del protocolo. Los tiempos de sangrado debieron haber influido poco en la variabilidad biológica antes mencionada, en virtud de que la variación en el tiempo de toma de muestras fue notablemente breve. Habitualmente los sangrados entre aves de un mismo grupo no difirieron más de 2 – 3 minutos.

Posteriormente, el manejo de los sueros fue rápido y bajo conservación fría (4 °C), a pesar de que es reconocida la estabilidad de la enrofloxacin a las condiciones ambientales estándar.

En lo referente a la prueba de Bennet *et al* (22) se constató que es posible generar datos repetibles con un mínimo de error intraensayo ($P=0.0001$) y una recuperación cercana al 100 % (27). Uno de los únicos inconvenientes que se observaron y que se solucionó inmediatamente fue que al incubar las placas se producía una condensación que en algunas ocasiones llegó a provocar problemas al momento de la lectura de los halos de inhibición. Esto fue solucionado colocando papel filtro estéril en la tapa de aluminio a fin de absorber el agua de condensación, impidiendo que esta se precipitara sobre el agar.

Durante el procesado de los sueros se corrieron las muestras coordinando su realización en un mismo día para un tiempo de muestreo determinado de todos los sueros en todos los grupos, con el fin de evitar cambios metodológicos.

Se ha descrito (23, 28) que la confiabilidad del método utilizado es similar al logrado con HPLC (*high pressure liquid Chromatography*), con la ventaja de que el costo es mucho menor y se procesan las muestras más rápidamente. Esta técnica, sin embargo, solo detecta la o las fracciones activas y no distingue la presencia de metabolitos inactivos. Empero, para el enfoque clínico de este ensayo, resulta prioritario lo primero y poco relevante lo segundo.

Considerando que en la avicultura moderna, las aves son criadas bajo condiciones extremadamente intensivas, utilizando el mínimo espacio vital posible durante 35-40 días para alcanzar el máximo crecimiento y producción posibles, casi cualquier problema infecto-contagioso se disemina rápidamente reduciendo el margen de ganancia o bien causando enormes pérdidas económicas¹. Evidentemente, la mortalidad, la morbilidad, las ganancias de peso e índices de conversión son las variables económicas más sensibles de estas explotaciones. De tal suerte, si se requiere evaluar la eficacia clínica de un antibacteriano en avicultura, se deben ponderar además de la eficacia clínica *per se* estas variables como parte esencial del análisis de eficacia y de la relación costo:beneficio. No obstante, no son pocas las situaciones en las que el veterinario no contempla este aspecto integralmente.

Dada la velocidad de los eventos que se pueden suceder en la producción avícola, a menudo no se medica en función de un diagnóstico preciso, sino como respuesta a una percepción empírica de que está por presentarse un brote de alguna enfermedad en la parvada. Como no es posible

permitir que una parte de la parvada se desarrolle sin medicación y sirva de testigo no tratado, nunca llega a saberse en realidad si la intervención antibacteriana fue oportuna o tan solo fue una percepción de que se evitó un problema mayor, a este tipo de medicación se le denomina metafiláctica². Así, la combinación de la presión comercial por hacer de la avicultura un negocio cada vez más rentable y la amplia disponibilidad de la enrofloxacin han hecho que se utilice este recurso antibacteriano no solo de manera terapéutica como lo indica la FDA en Estados Unidos, sino de forma metafiláctica y aún “preventiva”³. Las posibles consecuencias negativas para la salud pública entonces será la generación de resistencias bacterianas y la disminución de la eficacia clínica de esta molécula a corto o mediano plazo en medicina humana.

En el mismo sentido, cabe mencionar que resulta más grave aún utilizar a la enrofloxacin de manera “preventiva” mediante el uso de premezclas.

Las especies de *Campylobacter* son causantes comunes de diarreas en humanos teniendo posiblemente una mayor importancia epidemiológica incluso que *Salmonella* y *Shigella* juntas (7, 10, 29, 30). En algunos casos la diarrea inducida, no requiere la aplicación de antibacterianos, pero en pacientes en los que el problema perdura resulta esencial su uso. La campilobacteriosis es considerada una enfermedad zoonótica y entre sus reservorios se cuentan a las aves, los cerdos y las cabras. En estudios efectuados en Europa en los años de 1982-83 no se encontraron cepas resistentes a ciprofloxacina ni en humanos ni en aves. Sin embargo, en 1987-89 las resistencias se volvieron algo común. Muchas enterobacterias incluyendo *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* siguen siendo altamente susceptibles a ciprofloxacina, pero *Campylobacter spp.* a generado ya

¹ <http://stirrup.home.texas.net>

² Medicación aplicada al detectarse los primeros signos de enfermedad en una parvada

³ (<http://980409.htm> By [Jill Lee](#) April 9, 1998)

resistencias teniendo unos valores de CMI₉₀ de 0.25 a 0.5 µg/ml (31). En el Cuadro 8 se presentan las diferencias entre la susceptibilidad bacteriana a enrofloxacin en aves y en el hombre; en el Cuadro 9 se detallan los patrones de las concentraciones mínimas inhibitorias de varias especies de *Campylobacter sp.* y en el Cuadro 10 se resume la distribución de las CMIs de 123 aislamientos de *Campylobacter coli* y 202 aislamientos de *Campylobacter jejuni* de origen animal y humano en Dinamarca.

Se menciona que el aumento de la resistencia puede provenir del uso de compuestos quinolónicos, en particular de la enrofloxacin. No obstante, no se puede excluir la participación del uso de la norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacin y otros muchas fluoroquinolonas en los tratamientos para campilobacteriosis humana y otras patologías (1, 7, 31). Es de destacarse que la enrofloxacin fue finalmente aceptada por la FDA en 1999 para su uso en problemas específicos en la clínica de aves. Esta aprobación requirió casi dos décadas y entre las razones de más peso para generar esta tardanza esta el temor, fundamentado en ocasiones en hechos, de que las cepas bacterianas resistentes pueden pasar a los consumidores y provocar que los tratamientos con ciprofloxacina en el hombre se vuelvan ineficaces. Asimismo, se ha encontrado que las resistencias a las quinolonas en la industria avícola se encuentran en un rango de un 28% para la enrofloxacin y un 50% para el ácido nalidíxico (31, 30). En México a pesar del uso intensivo que se le ha dado a la enrofloxacin no existen estudios suficientes que aporten datos de las resistencias generadas por la misma o por cualquier otra quinolona.

Se ha estimado que la frecuencia de generación espontánea de resistencias bacterianas a la enrofloxacin es extraordinariamente baja; cuando más 1 bacteria por cada 1×10^{12} bacterias expuestas a una concentración subterapéutica (1, 32, 33, 34). Empero, dados los factores mencionados y considerando que es el fármaco más vendido en México para tratamiento de enfermedades en el agua de bebida, la situación puede variar.

La valoración de las concentraciones mínimas inhibitorias de enrofloxacin para *Escherichia coli* y *Campylobacter sp* indican que es factible asumir que los patrones de resistencias han aparecido en México. Esta apreciación empírica se basa en los altos porcentajes de resistencias encontradas en las pruebas efectuadas en los estados de Querétaro, Celaya, Torreon, Morelos y Guadalajara, donde se encontró que considerando un punto de inflexión de 0.5 µg/ml (para la ciprofloxacina de acuerdo a la NCCLS), se obtuvo que un 57.6 % de las cepas estudiadas de *Campylobacter sp* son resistentes a enrofloxacin y un 53.3 % de las cepas estudiadas de *Escherichia coli* son resistentes a enrofloxacin.

Para que la enrofloxacin y las fluoroquinolonas tengan una mayor eficacia, se les debe medicar en forma de bolo⁴ (en los anexos 7, 8 y 9 se mencionan algunas características relevantes del tracto digestivo en aves), procurando una concentración plasmática máxima ($C_{s_{max}}$) en el menor tiempo posible (t_{max}) (36, 37). Es esta una de las razones por las cuales no se permite el uso de la enrofloxacin en premezclas en países como Estados Unidos de Norteamérica y Canadá ^{5,6}. En función de esto, a la premezcla se le considera como una presentación farmacéutica equivocada, susceptible de generar la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibacterianos más potentes de la historia, las fluoroquinolonas, en especial la enrofloxacin. (38, 39)

Resulta aparentemente congruente decir que la eficacia de un fármaco depende de la dosis administrada, la susceptibilidad del patógeno al mismo y de sí se logran mantener las concentraciones mínimas inhibitorias u óptimas antibacterianas en la sangre y los tejidos (40). Empero, muchos otros detalles

⁴ Toda la dosis del día en una sola toma o inyección.

⁵ <http://www.fda.gov/cvm>.

⁶ <http://antimicr.htm> Thursday, January 14, 1999

tendrán que tomarse en cuenta; por ejemplo: si el antibacteriano tiene acción en el medio celular específico si el consumo de agua de las aves enfermas no ha sido alterado. Al respecto, vale la pena destacar que la mayoría de los cálculos de consumo de agua proviene de observaciones en aves sanas (41, 36), en muchas ocasiones se medica junto con aditivos minerales, los cuales se ha demostrado que disminuyen la biodisponibilidad del fármaco (42). Por tanto se debe ajustar la dosis o concentración del fármaco que el médico colocó en el tinaco o el dosificador a dicha variable. Es menester considerar la calidad del agua también como ya se mencionó y si las instalaciones de la tubería son las adecuadas. Adicionalmente, en México se presenta la necesidad de ponderar si la presentación farmacéutica tiene la calidad necesaria. Para la enrofloxacin, se ha demostrado una enorme variación en los componentes de las presentaciones farmacéuticas, incluso añadiendo moléculas afines como ciprofloxacina (3, 43). Pero más grave aún es el hecho de contar con una variedad de calidades de la enrofloxacin *per-se*. A la fecha se puede contar con enrofloxacinas de origen chino, hindú, español, alemán, brasileño, etc., y diversas formulaciones, todas ellas con potencias notablemente distintas. Como a menudo ocurre con los fármacos, existe una correlación directa entre precio y calidad del principio activo.

Así, el escenario que se puede presentar en una explotación es la aplicación incorrecta de la enrofloxacin, con un resultado clínico negativo que provoque la especulación de que se ha generado resistencia bacteriana del agente a tratar, cuando en realidad la aparente ineficacia de este agente tuvo otro origen. Por ejemplo, se pueden haber sumado los errores al aplicar enrofloxacin de baja potencia, en un tinaco de lámina galvanizada, que no tiene tapa y que expone a la luz ambiental a la enrofloxacin, no se purgaron las tuberías y el agua utilizada en la explotación es de elevada dureza. Adicionalmente, no se restringe el agua (0.5-1 hora) y las aves no la ingieren con avidez para lograr la administración lo más parecida a un bolo, situación ésta que puede significar la diferencia para muchos antibacterianos y en

especial para la enrofloxacin para la que es más conveniente tener un valor elevado de $C_{s_{max}}$ que una permanencia prolongada en el organismo (1, 29, 32, 44). Además de estos errores, es común encontrar que el veterinario se le ocurra combinar a la enrofloxacin con otras sustancias en el tanque, práctica que muy a menudo resulta en la neutralización parcial de la enrofloxacin dado que la molécula es relativamente reactiva (36, 44). Con este panorama la confiabilidad o reproducibilidad de respuestas clínicas al antibacteriano más potente destinado para medicina veterinaria, será entonces, muy baja.

La enrofloxacin (1-ciclopropilo-7-(etilo-1-piperazinilo)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolincarboxílico) es un derivado fluorinado del núcleo quinolino-ácido carboxílico que fue desarrollado para uso exclusivo en medicina veterinaria (45). Tiene buena absorción en gran variedad de animales domésticos después de su administración oral o parenteral. Su alta biodisponibilidad y buena penetración en los tejidos, resulta en buenas concentraciones plasmáticas (27, 37, 31, 45).

En el Cuadro 7 se detallan los valores farmacocinéticos encontrados por varios autores. La enrofloxacin es parcialmente metabolizada en el hígado a ciprofloxacina, un fármaco de gran uso terapéutico en humanos. La excreción renal es su mayor ruta de eliminación, tanto por filtración como por excreción tubular (37)

Los estudios farmacocinéticos han demostrado que las concentraciones de enrofloxacin en el suero y en los tejidos se encuentran arriba de 0.25 μ g/ml en los CMI's de la mayoría de los microorganismos Gram negativos, validando así su eficacia (1, 37)

La evaluación de la farmacocinética de enrofloxacin después de inyección intravenosa de 10 mg/kg en un modelo de dos compartimentos muestra que primero se distribuye en tejidos perfundidos y sangre (fase de distribución rápida) con una vida media de distribución ($T_{1/2\alpha}$) de alrededor de 5.58 min. Sus volúmenes aparentes de distribución son elevados (v.g., V_{dss} = volumen de distribución en el estado estable, 2.43 l/kg y V_{dAUC} = volumen de distribución área, 2.7 l/kg), lo que indica una gran distribución de enrofloxacin fuera del plasma (37, 31). La vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) observada en aves fluctúa entre 4.05 hrs y 10 horas (7, 45), sin embargo en este ensayo la vida media para todas las enrofloxacinas evaluadas fluctúa entre 12.5 y 5.58 hrs, con lo anterior se puede mencionar que se garantizan concentraciones tisulares importantes, al menos, por 24 horas. Los valores tan prolongados de la $T_{1/2\beta}$ se atribuyen al bajo grado de filtración glomerular en aves con respecto al de los mamíferos (45). El porcentaje de transferencia de enrofloxacin del compartimento central al periférico ocurre, aparentemente, de manera tan rápida como en dirección inversa (K_{12} y K_{21}), lo que confirma su elevada difusión y liposolubilidad (7, 29, 45).

La velocidad de absorción de la enrofloxacin es más rápida posterior a la aplicación subcutánea o intramuscular en comparación con la oral ($T_{1/2}$ abs IM = 0.37 h; $T_{1/2}$ abs SC, 0.36 h y $T_{1/2}$ abs PO, 0.92 h). Se calculan los porcentajes de biodisponibilidad en: IM = 87.51%; SC = 80.78% y PO = 59.58% (7, 29). En este ensayo no se determina la biodisponibilidad de la enrofloxacin por la vía oral dado que no se realizó una cinética intravenosa, pero si se comparan las biodisponibilidades promedio obtenidas cuando el fármaco se aplica en dosis de 0.2 g/ml o dosis de 0.1 g/ml. En este sentido se obtuvo una C_{smax} mayor (426 %) en los antibióticos aplicados a dosis de 0.2 g/ml sobre los que aplicaron a dosis de 0.1 g/ml. Pero en lo que respecta a la $T_{1/2\beta}$ fue similar en los 6 grupos, encontrándose también que los 4 productos no son bioequivalentes ($P= 0.0009$, en cuanto a diferencia entre grupos).

La rápida absorción y buena biodisponibilidad de la enrofloxacin le confieren una notable ventaja en casos severos en los que las aves disminuyen drásticamente su consumo de agua. En el hígado se alcanzan las concentraciones máximas de enrofloxacin, seguido de pulmón y riñón y la más baja en cerebro (42). De acuerdo con algunos estudios la enrofloxacin desaparece completamente de todo el tejido después de 3 días; sin embargo, el periodo de retiro de rastro en Estados Unidos es de 12 días. Si se considera una $T_{1/2\beta}$ de 10 hrs, entonces el tiempo de retiro será de 200 hrs (8 días aproximadamente) conforme a lo descrito por Sumano y Ocampo (1) quienes proponen 20 $T_{1/2\beta}$ de retiro para los fármacos con cinética de primer orden y sin fase de eliminación (γ) (32).

Cabe destacar que no se encontraron notables diferencias en la $T_{1/2\beta}$ entre las enrofloxacinas evaluadas, aunque en particular una de las enrofloxacinas similares (grupo 5) presentó una $T_{1/2\beta}$ diferente a los demás grupos (grupos 1, 2, 3, 4 y 6). Resulta factible pensar que estas diferencias no pudieron haberse dado por la identidad química del principio activo, dado que el análisis de identidad y concentración que se realizó mediante HPLC reveló la pureza y confiabilidad de las presentaciones usadas. Sin embargo, es posible que los vehículos propicien la diferencia referida, aunque se tendrían que realizar los análisis correspondientes.

Comparando su administración en el agua de bebida a una concentración de 100 ppm, con la aplicación vía IM de una dosis equivalente, se ha observado que fueron similares los valores de $C_{s_{max}}$ y la persistencia de enrofloxacin en concentraciones plasmáticas bactericidas contra *Pasteurella spp* y coliformes, aviares (37). En este ensayo se demuestra que la administración concentrada de enrofloxacin en el agua de bebida aumenta el nivel de $C_{s_{max}}$ (en proporciones extremas de 0.9 $\mu\text{g/ml}$ a 3.75 $\mu\text{g/ml}$, entre el

grupo 1 y 2), con lo que la hipótesis planteada en este trabajo resultó verdadera. Las implicaciones de este hallazgo pueden tener repercusiones importantes a nivel clínico dado que con la simple maniobra de reducir a la mitad el contenido de un tinaco y agregar la misma cantidad de enrofloxacin, se tendrá un $C_{s_{max}}$ mayor y con ello una eficacia que puede pasar de buena a excelente o de ineficaz a eficaz en virtud del conocimiento de que el doble de la CMI se convierte en concentración óptima bactericida.

8. LITERATURA CITADA

- 1.-Sumano LH. Quinolonas y Fluoroquinolonas en medicina veterinaria. Rev. Vet. Mex 1993;2:24-28.
- 2.-Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: Activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity, Cornell Vet 1990;80:73-186
- 3.-Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. 2ª ed. Mexico: McGraw Hill/ Interamericana, 1997.
- 4 Goodman GT, Rall TW, Nies AS, Taylor P. Las Bases Terapéuticas de la Farmacología. 8a ed. México: Panamericana, 1990.
- 5.- Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 4a ed. El Manual Moderno.México, 1993.
- 6.-Shenl L, Pernet AG, Mechanism of inhibition od DNA gyrase by quinolone antibacetrials : specificity and cooperativity of drug binding to DNA. Biochemistry. 1989;28:3879-3885.
- 7.-Abd-el-aziz MI, Aziz MA., Soliman FA, Afify NA. Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens British Poultry Science 1997;38:64-168.
- 8.-Baudity P. Results of clinical studies with Baytril in poultry. Veterinary Medical Review 1987;2;130-136.
- 9.-Scheer M. Concentrations of active ingredient in the serum and tissue after oral and parenteral administration of Baytril. Veterinary Medical Review 1987;2:104-118.
- 10.-Anadon A, Martinez M.R.Díaz MJ, Bringas P, Martinez MA, Fernandea-Cruz ML, Fernandez MC, Fernandez R. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. Am.J.Vet.Res 1995;56: 501-506.
- 11.-Sumano, L.H., Ocampo C.L. and Brumbaugh G.W. Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. Br. Poultry Sci. 1998;39:37-42.

- 12.-Flammer K, Aucoin DP, Whitt DA, Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in african grey parrots following single and multiple doses. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1991;14:359- 366.
- 13.- Perez TE, Urbieta M, Lopategui CL. Antibiotics in Veterinary Medicine and public healt Lancet British edition 1995;42:543-554
- 14.- Jacobs-Reitsman WF, Koenraad PMFJ, Bolder NM, Mulder RWAW. In vitro sesceptibility of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from broilers to quinolones , ampicilin, tetracycline and erytromicine . Veterinary Quarterly 1994;4:199-208
- 15.-Erdeger J; Diker KS. Multiple antibiotic resistance in poultry isolates of *Campylobacter*. Journal-of-Antimicrobial-Chemotherapy 1991;27;199-208.
- 16.-Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg. Journal Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter spp.* from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997;41:2244-2250.
- 17.-Koenraad PMFJ, Jacobs RWF, Laan-T-van-Der, Beumer RR, Rombouts FM, Van-der-Laan-T. Antibiotic susceptibility of campylobacter isolates from sewage and poultry abattoir drain water. Epidemiology-and-Infection. 1995;115: 475-483.
- 18.-Koh HB, Kang MI, Kim GN. Antimicrobial drug susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from cronic respiratory diseases outbreaks. Kor.J of Vet Public Healt. 1993;1:63-68.
- 19.-Küng,K,J., Riono L., Wolffram S., and Wanner H., (1983) Comparision of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial Concentrations after intravenous and oral administration od enrofloxacin in four dogs. Res in Vet Sc, 54:247-248.
- 20.-Perez-Trallero-E; Urbieta-M; Lopategui-CL; Zigorraga-C; Ayestaran-I. Antibiotics in veterinary medicine and public health. Lancet-British-edition. 1993, 342: 8883, 1371-1372.
- 21.-Hannan PCT, Windsort HM, Ripley PH. In Vitro susceptibilities of recent field isolates of *Mycolasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to

- valnemulin (Econor R) tiamulin and enrofloxacin and thje in vitro development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res. in Vet Sci 1997;63:157-160
- 22.-Bennet, J.B., Brodie, J.L.,Benner, E. J. & Kirby, W.M. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. American Society of Microbiology, 14, 170-177.
- 23.- Küng K.J., Riond L., Wanner M., Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. J.Vet.Pharmacol. Therapeut. 1983;16:462-468.
- 24.-Carter G.R. Bacteriología y Micología Veterinarias. México:El Manual Moderno, 1985.
- 20.- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston NL. Microbiología Médica. 13^a ed. México: El Manual Moderno, 1990.
- 26.-Martinez PJ, Vazquez MR, Rodruguez SC, Miranda MRE, Romo Gal, Nader GE. Procedimientos de Bacteriología y Micología Veterinarias. 2a ed. México: Universidad Nacional Autonoma de México, 1989.
- 27- Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian Escherechia coli strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. J. Clin Microbiol. 1997;5:2184-2185.
- 28.-Intorre L, Mengozzi G. Bertini S, Bagliacca M, Luchetti E, Soldani G, The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and metabolite ciprofloxacin in the muscovy duck. Veterinary Researche Communication, 1997;21:127-136
- 29.-Puyt JD. Antibiotic therapy in poultry production. Bulletin des G.T.V. 1995;5: 17-1105.
- 30.- Hinz KH, Will B. Antibacterial in vitro efficacy of enrofloxacin agains *Haemophilus paragallinarum* . Berliner und Munchener Tierarztliche Wochensschrife 1998;12:409-412.

- 31.- Kho HB, Kang MI, Kim GN. Antimicrobial Drugs Susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chronic respiratory diseases outbreaks. *Kor J of Vet Public Health*. 1993;17:63-68
- 32.- Raul Rodríguez García. Evaluación de la mezcla enrofloxacin trimetoprim *in vitro*. Para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista, México, D.F.1997.Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México
- 33.-Butaye P, Ducatelle R, Backer P de , Vermeerssch H., Haesbrouck I, y De Backer P, *In vitro* activities of doxycycline and enrofloxacin against European *Chlamidia psittaci* from turkeys. *Antimicrobial-Agentsand Chemotherapy* 1997;41:12800-12801
- 34.-Friis NF and Szancer J. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. *Acta Veterinaria Scandinava*. 1994;35:389-394
- 35.-SalaV, Bertoldini G. Activity of a new quinolone (enrofloxacin) against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from pigs. *Praxis Veterinaria Milano* 1989;10:10-11
- 36.-Endtz-HP; Ruijs-GJ; Klinger-B-van; Jansen-WH; Reyden-T-van-der; Mouton-. RP; Van-Klinger-B; Van-der-Rayden-T. Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Veteriner-Fakultesi-Dergisi,-Ankara-Universitesi*. 1995, 42: 4, 543-54
- 37.- Prescott JF. Antimicrobial susceptibility testing and antimicrobial drug dosage. *J Am Vet Med Assoc* 1985;4:363-368.
- 38.- Baggot JD. Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals. *J Am Vet Med Assoc* 1980;10:1085-1090.
- 39.- Angulo FJ. Significance and sources of antimicrobial-resistance *Salmonella* infections in humans in the United States the need for prudent use of antimicrobial agents, including restricted use of fluoroquinolones, in food animals. *American Association of Bovine Practitioners Conference*. 1998;31:1-8.

- 40.-Sumano LH, Gracia MI, Romero V, Ruiz-Ramirez L. The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Veterinary and Human Toxicology*.1994;5:476-477.
- 41.-Russel ID. Proper water medication with good water systems. *Poultry Digest* 1992; 40-48
- 42.- Randal J.M, Randall M.C. Interactions with others drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management. *Clinical Infectious Diseases* 1992;14:274-284.
- 43.-Paige JC, Tollefson L, Miller MA. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Vet. Clin North Am Food Anim Pract.* 1999;15:31-43.
- 44.-Wages DP. Proper medication procedures. *Poultry Digest.* 1997;56: 18-19
- Salmonella sp: veterinary pointers. LANCET* 1997;336:125.
- 45.- Anne E, Asuquo J, Piddock V. Accumulation and killin kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1993;31;865-880.
- 46.-Dorrestein DJ; Van Miert ASJPAM. Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1988;11: 33-44.
- 47.- Garcia Ovando H; Luders C; Gorla N; Errecalde C; Prieto G. Intravenous pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chickens. *Proceedings of the 7th European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology International Congress;1997 July 6-10.Madrid Spain.* 1997;20(suppl):202
- 48.- Knoll U., Glunder G., Kietzmann M. Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 1999;22;239-246

9. FIGURAS

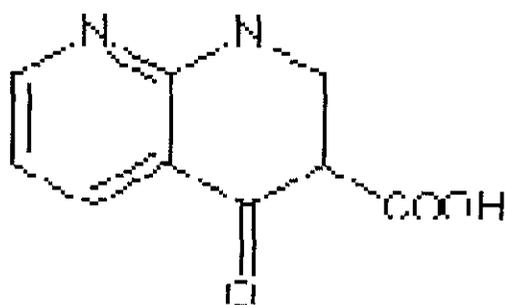


Figura 1.- Fórmula estructural del ácido nalidíxico.

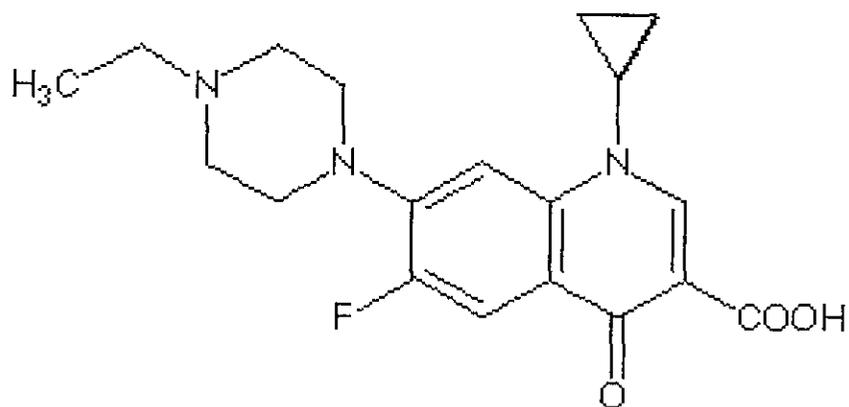


Figura 2.- Fórmula estructural de la enrofloxacina

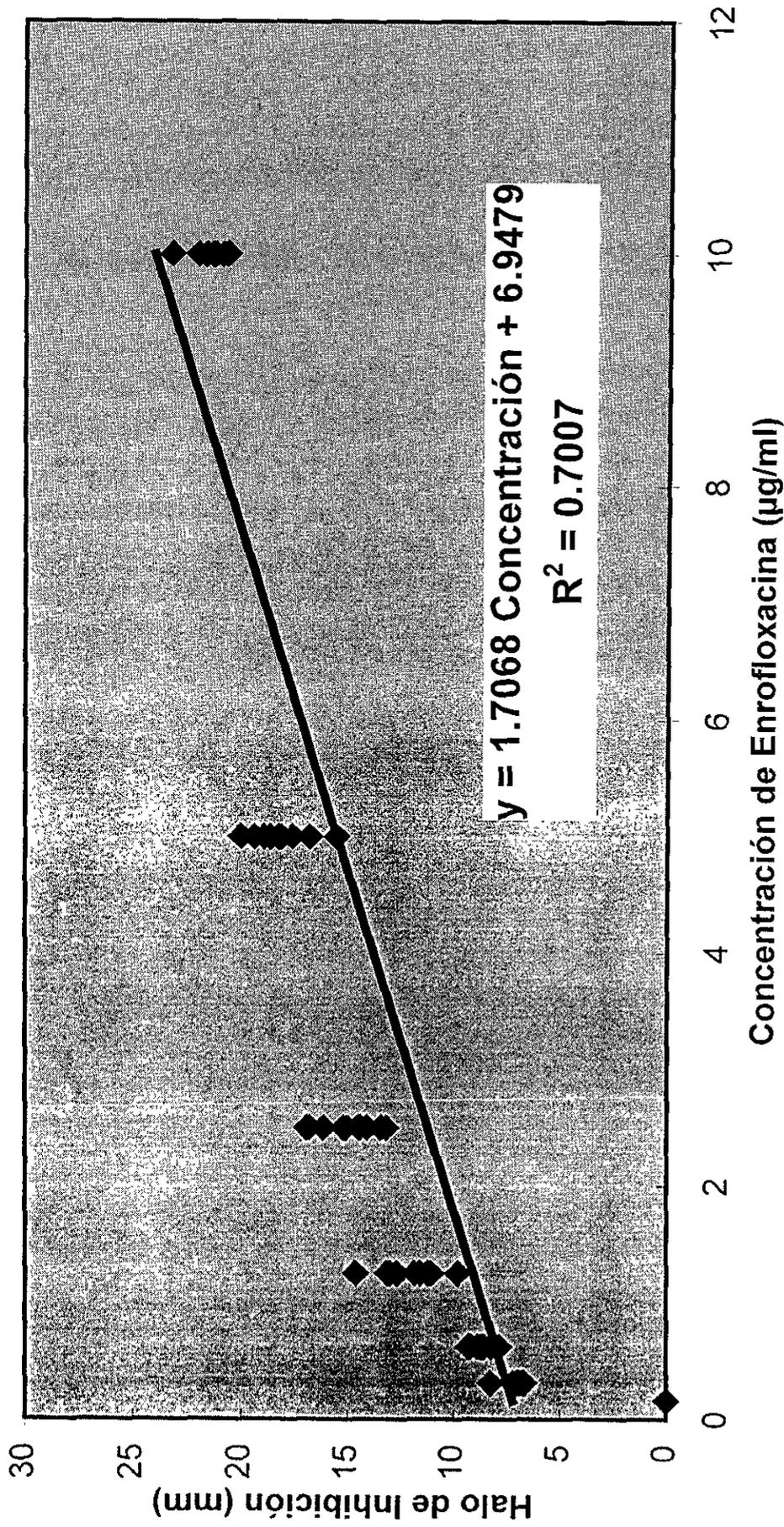


Figura 3. Curva de regresión ajustada del estándar de la eficiencia antibacteriana de enrofloxacin por difusión en agar.

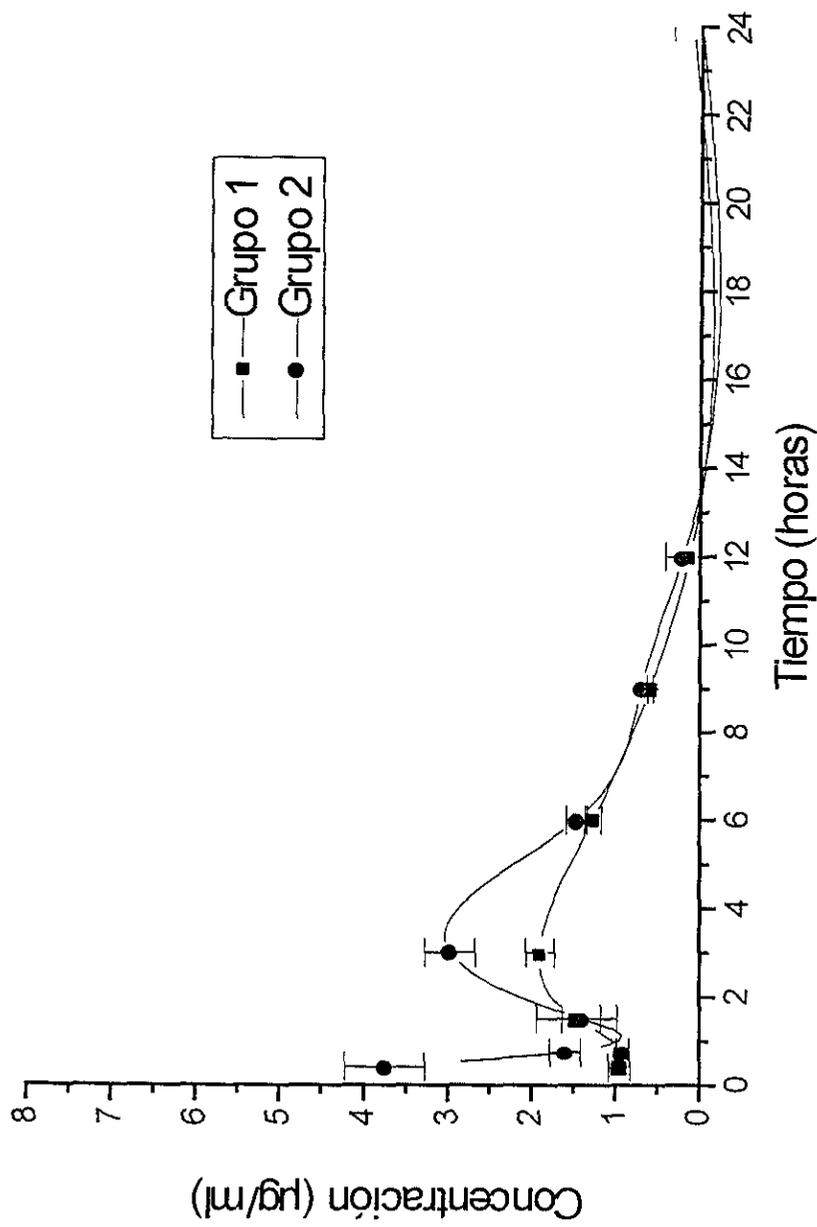


Figura 4.- Comparación de concentraciones séricas de enrofloxacin en pollos de engorda con diferentes concentraciones 0.1% (Grupo 1) y 0.2% (Grupo 2).

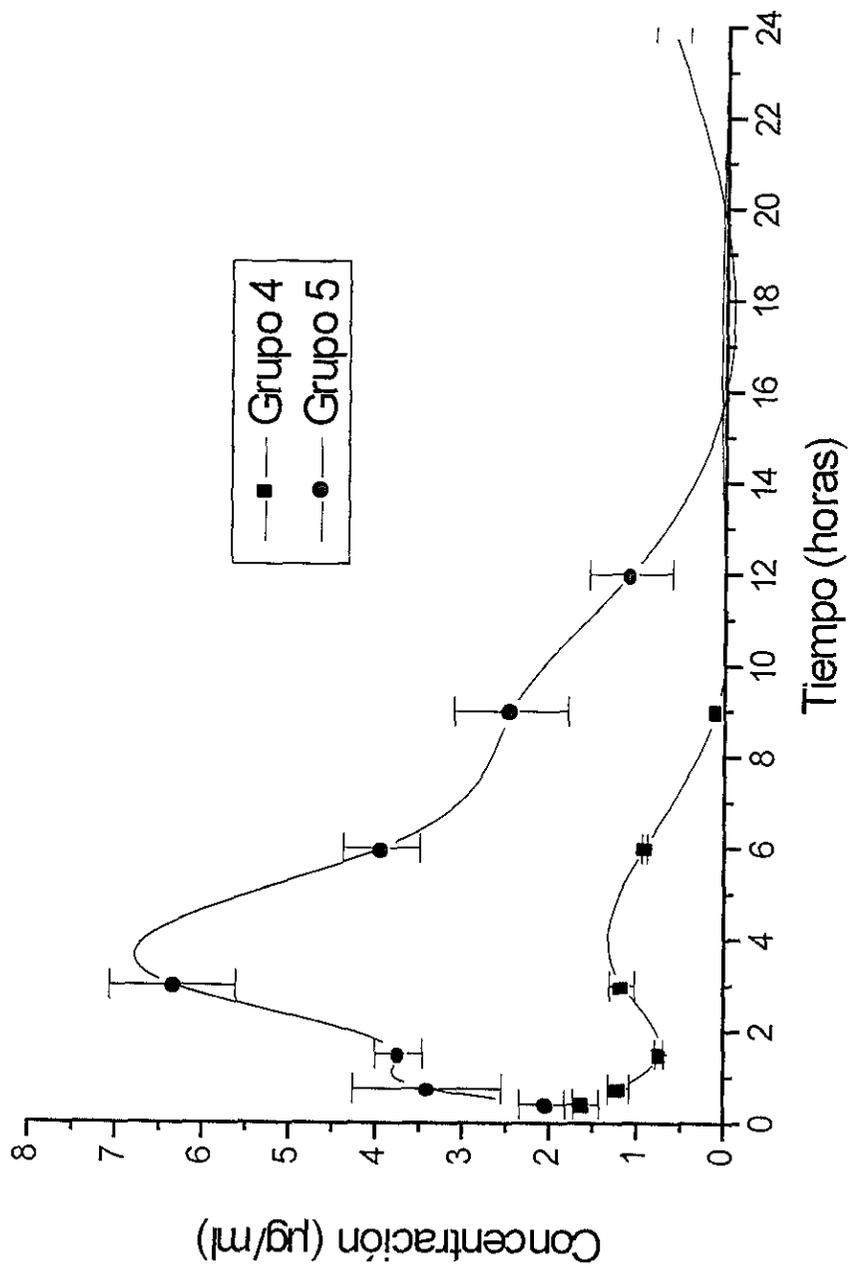


Figura 5. Comparación de concentraciones séricas de enrofloxacina en pollos de engorda con diferentes concentraciones 0.1% (Grupo 4) y 0.2% (Grupo 5)

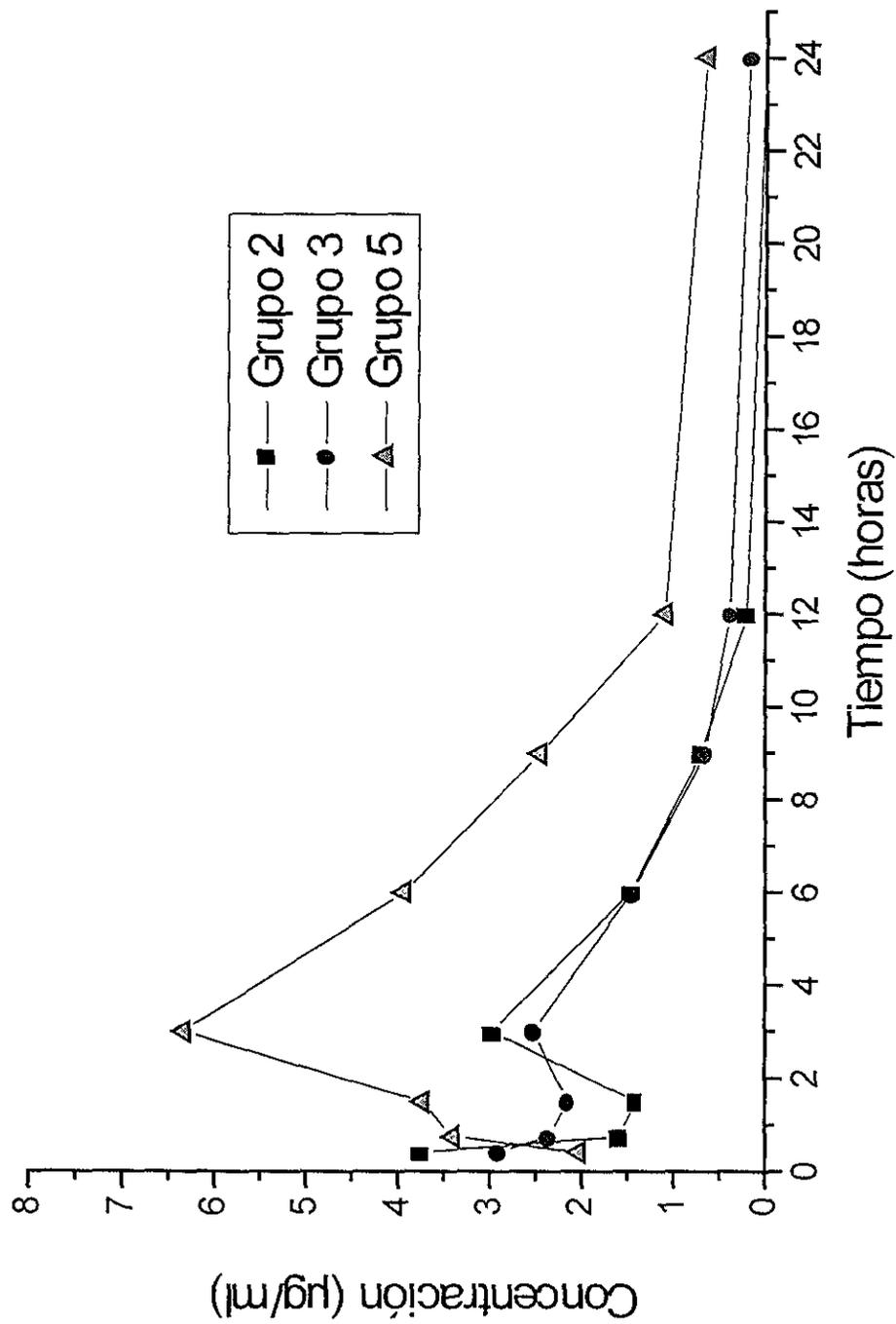


Figura 6. Concentraciones séricas de enrofloxacin en aves durante 24 en los grupos 2, 3 y 5, a los cuales se les aplico una dosis al 0.2%

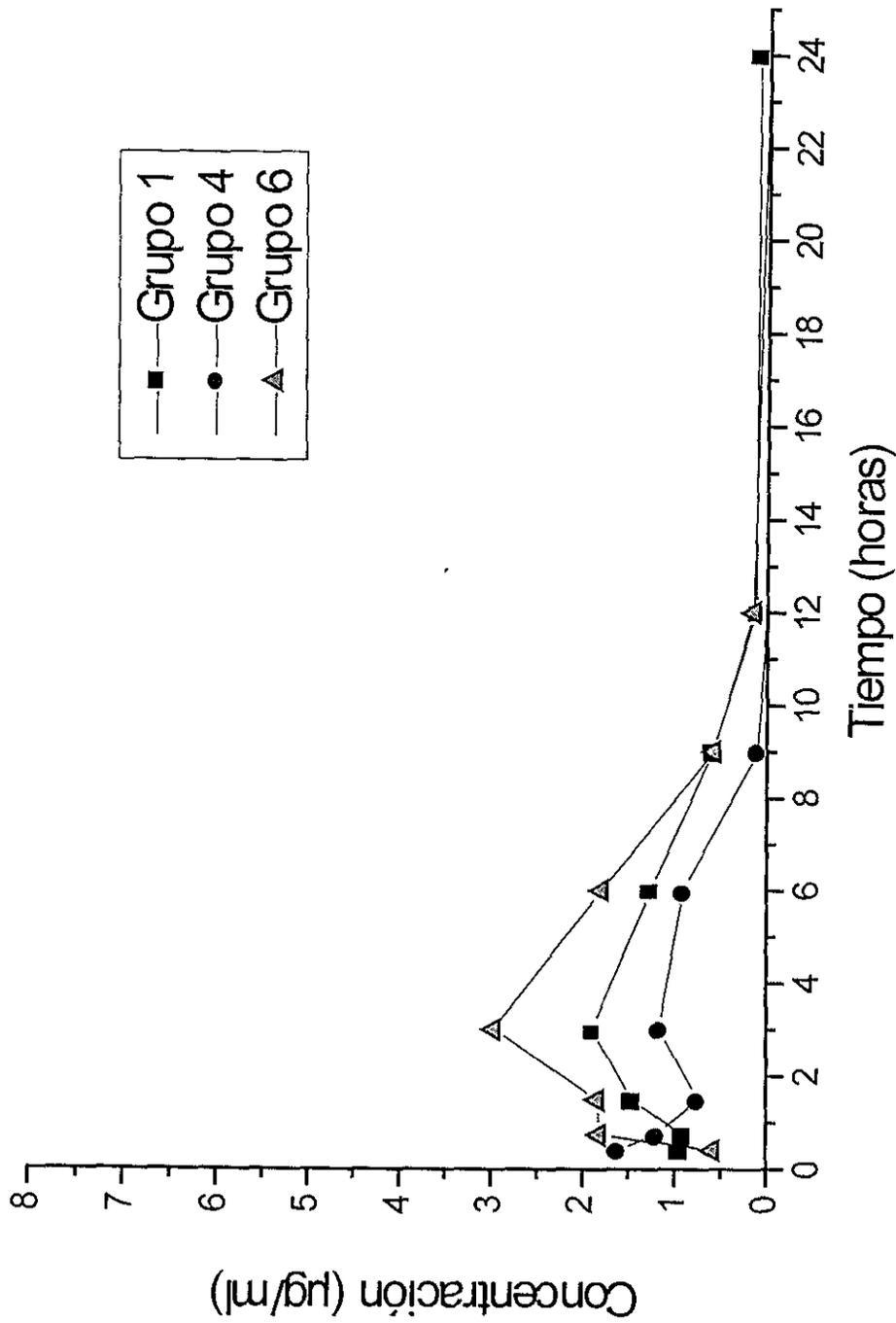


Figura 7. Concentraciones séricas de enrofloxacin en aves durante 24 en los grupos 1, 4 y 6, a los cuales se les aplico una dosis al 0.1%

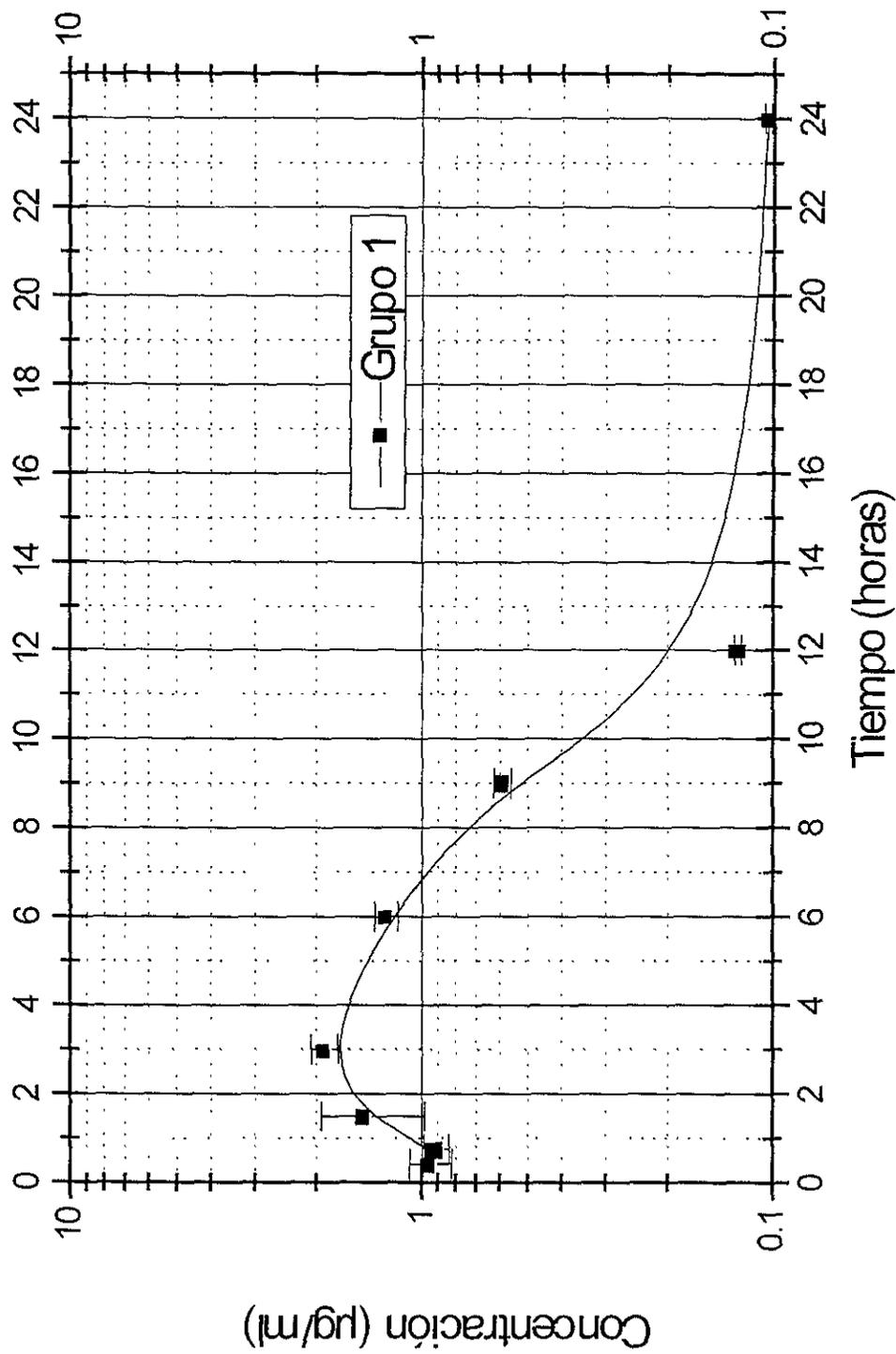


Figura 8. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 1.

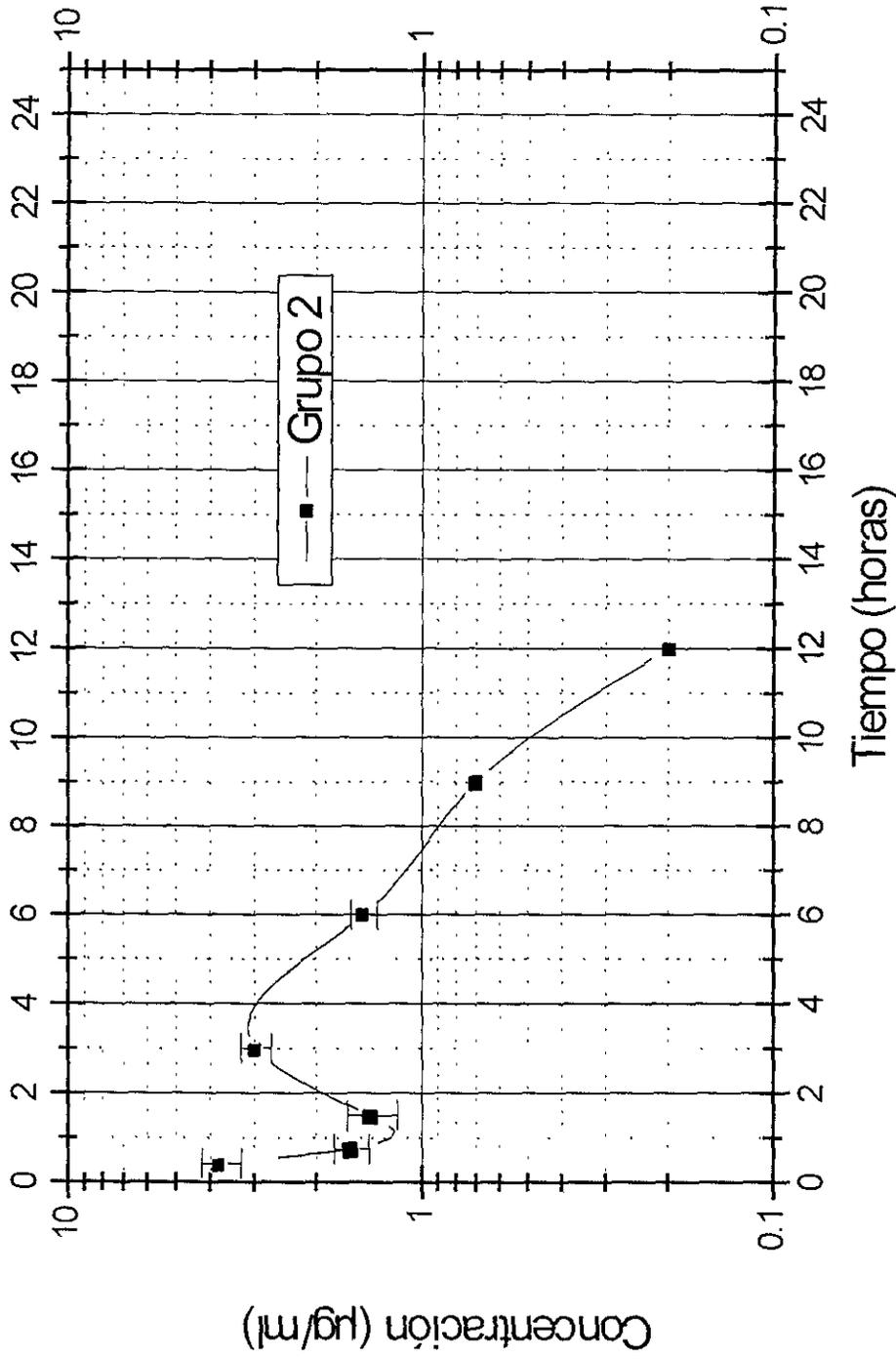


Figura 9. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 2

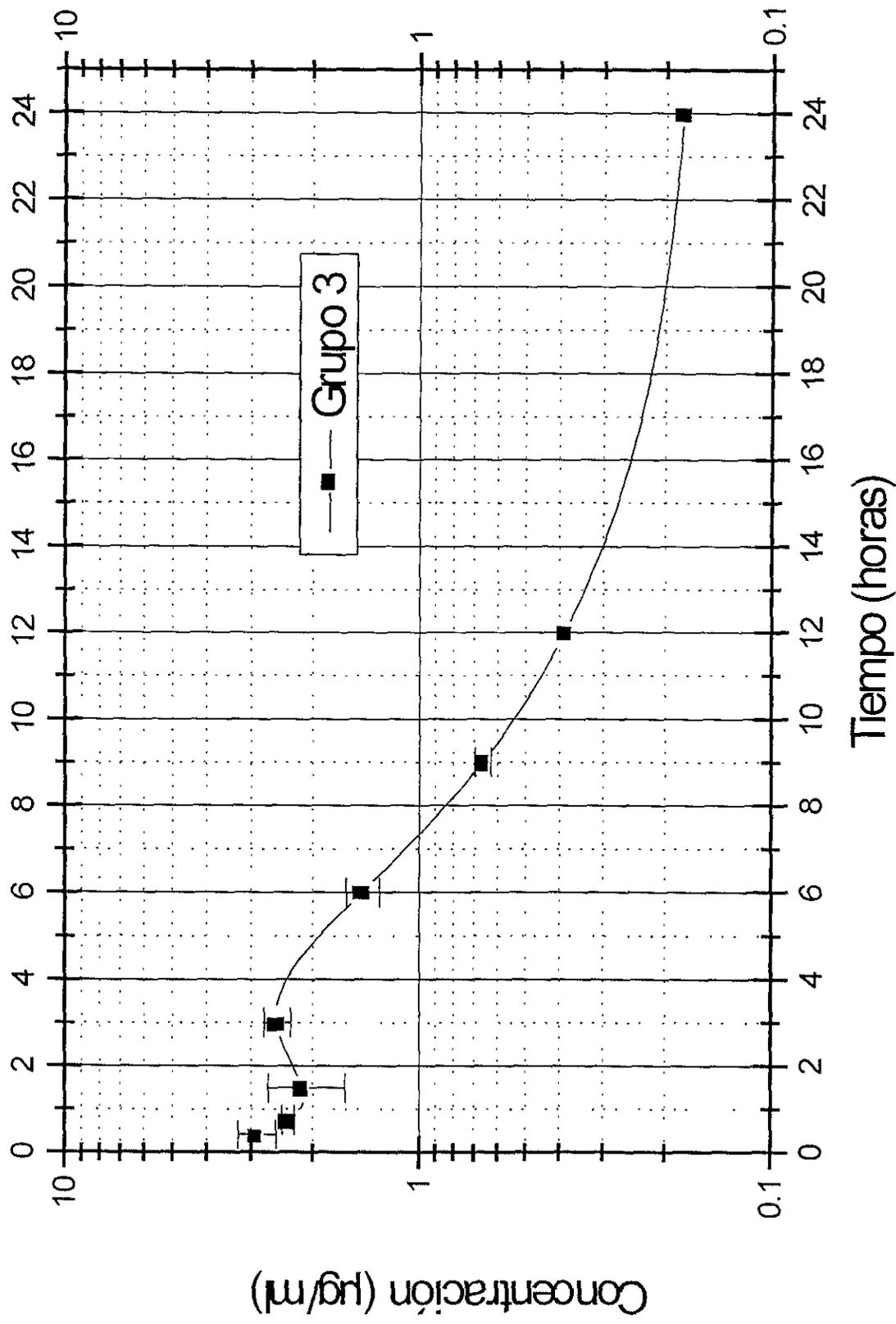


Figura 10. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 3

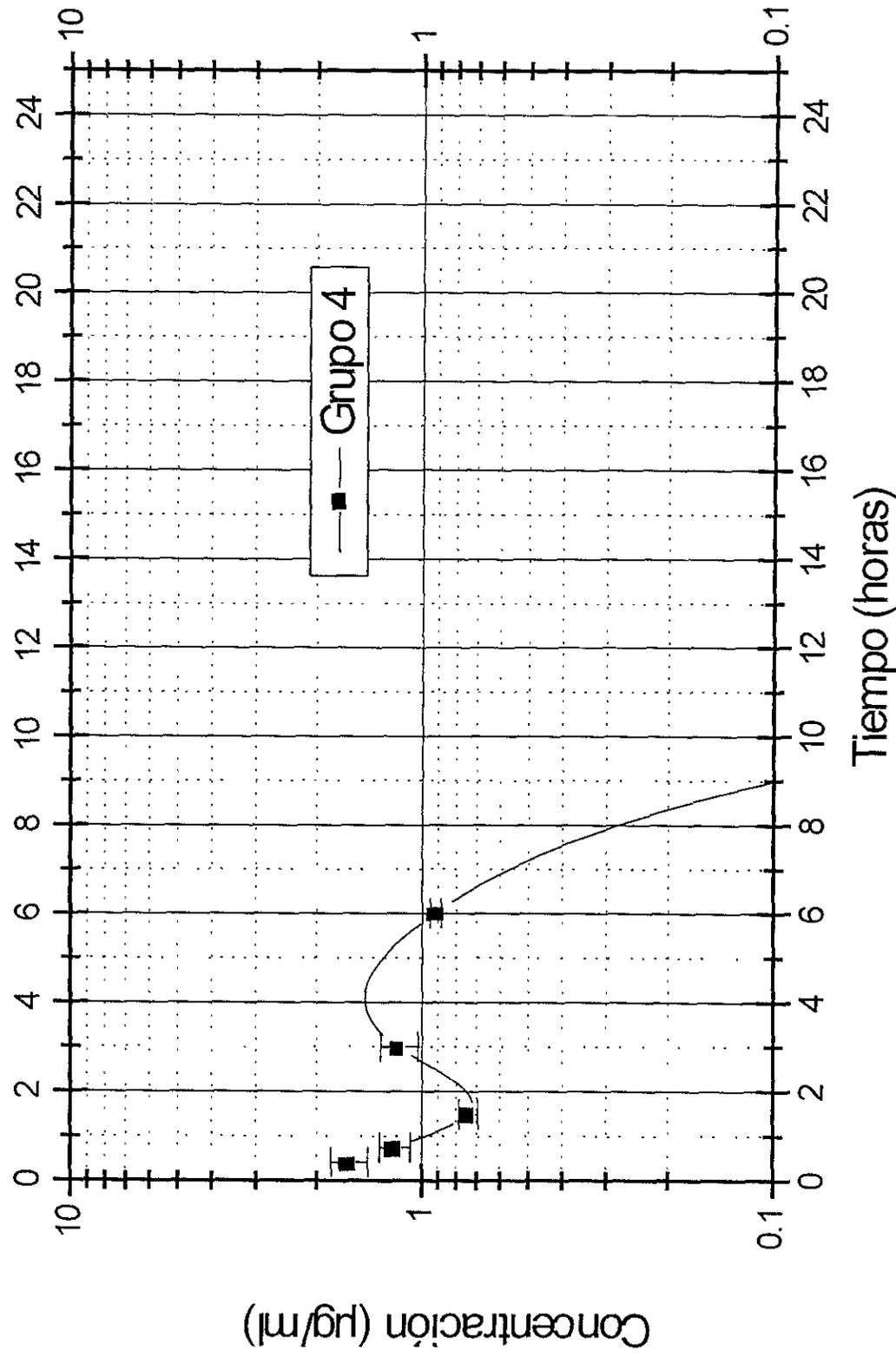


Figura 11. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 4

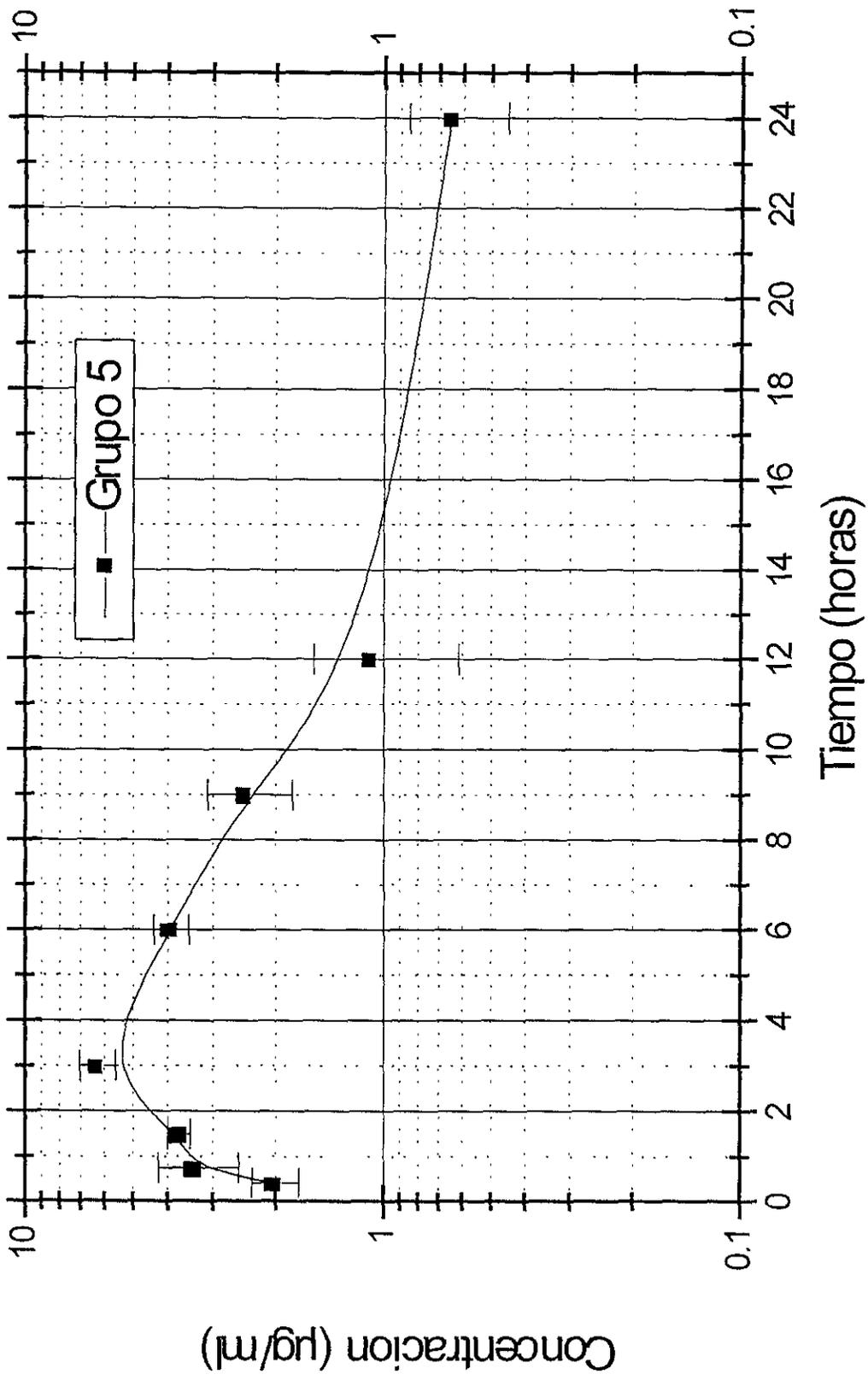


Figura 12. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 5

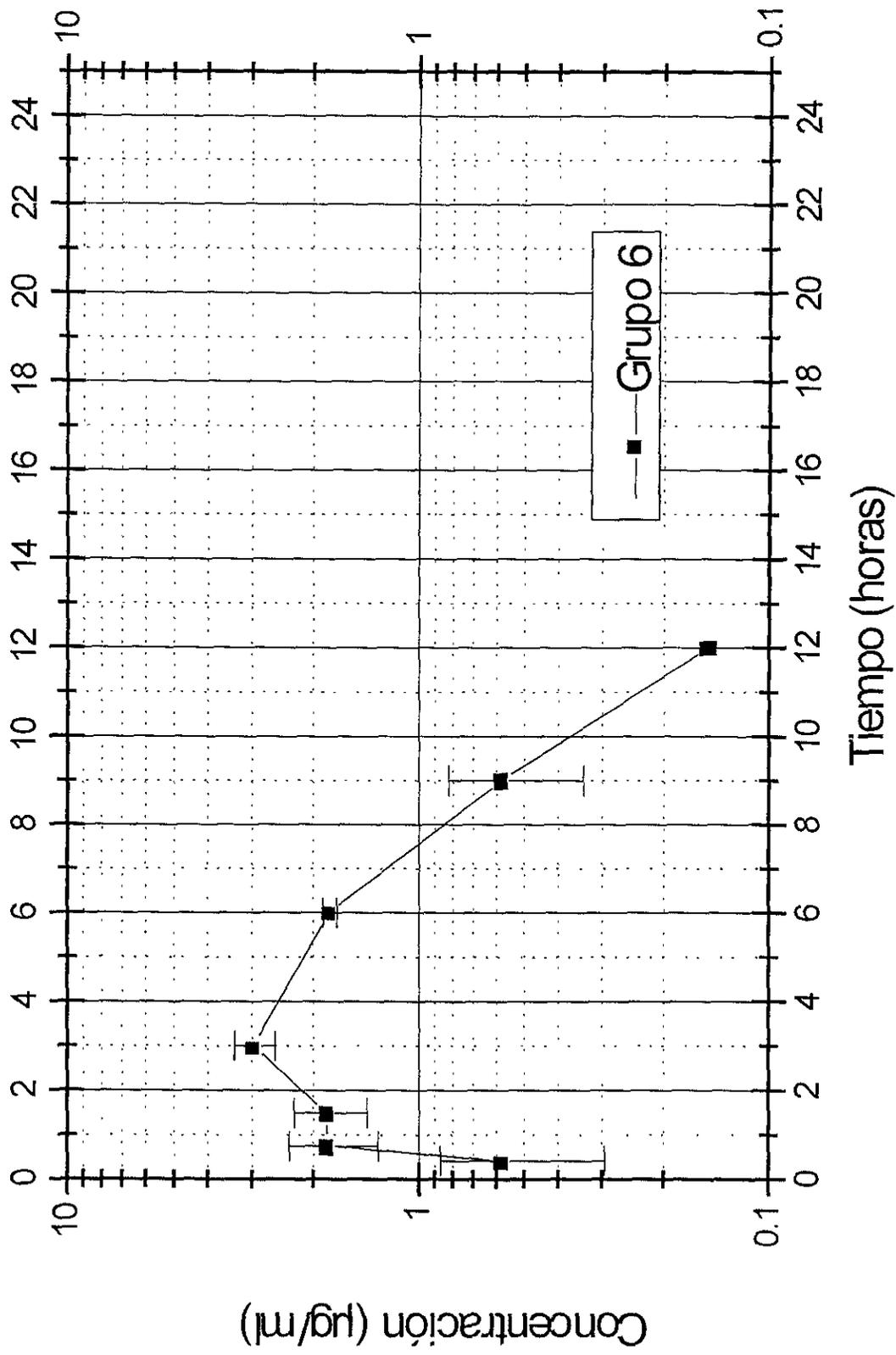


Figura 13. Curva de concentraciones séricas de enrofloxacin en el grupo 6

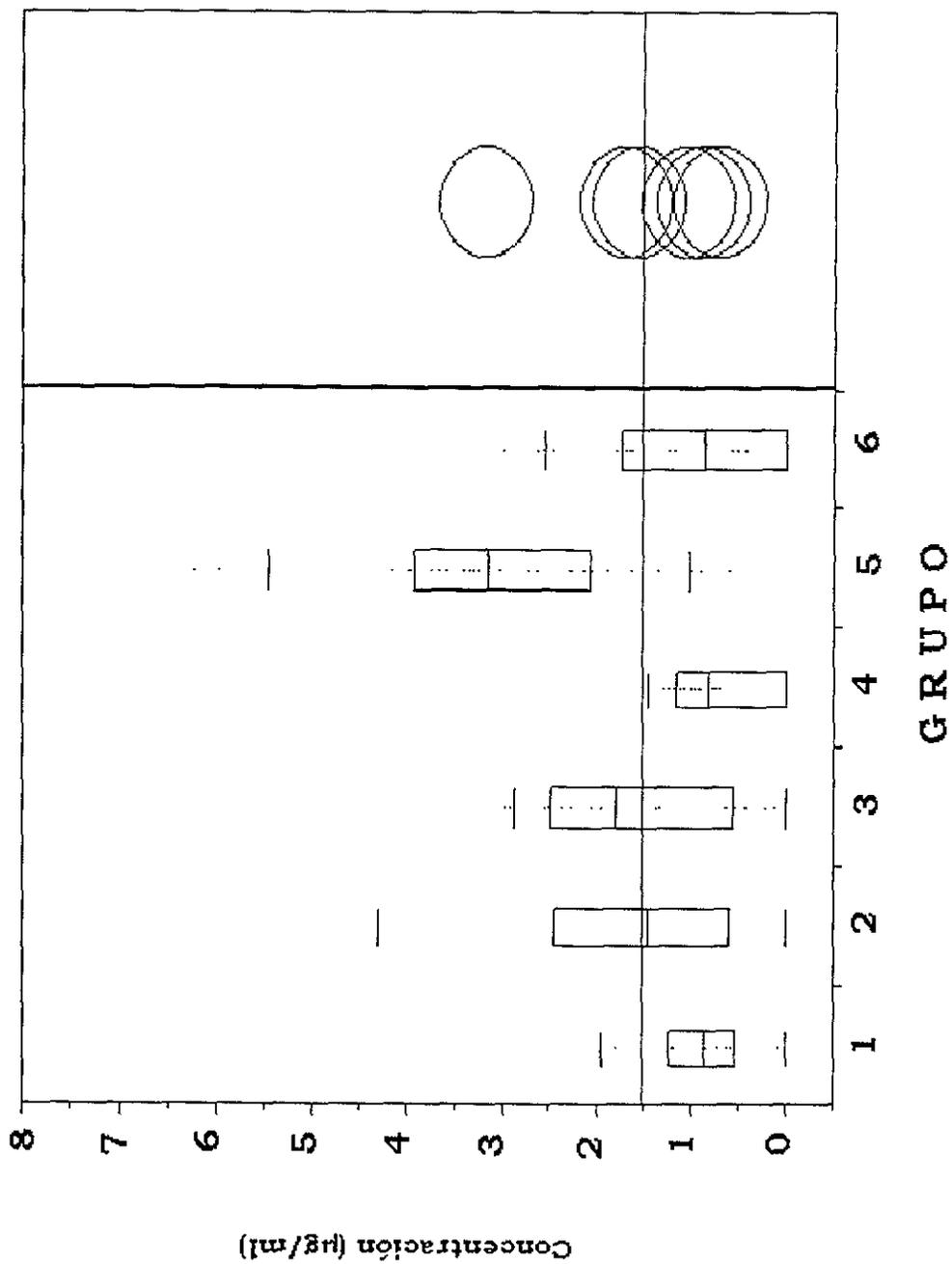


Figura 14. Comparación estadística del comportamiento de las concentraciones séricas de enrofloxacin en aves al 0.1% (grupos 1, 4 y 6) y al 0.2% (grupos 2, 3 y 5)

10. CUADROS

Cuadro 1.
Concentraciones minimas inhibitorias de diversas bacterias a
Enrofloxacina

Bacteria	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀ (µg/ml)	× CMI (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	*	*	0.06
<i>Klebsiella sp</i>	*	*	0.06
<i>Salmonella sp</i>	*	*	0.03
<i>Proteus sp</i>	*	*	0.25
<i>Serratia marcesens</i>	*	*	0.12
<i>Citrobacter sp</i>	*	*	0.25
<i>Yersinia sp</i>	*	*	0.01
<i>Campylobacter sp</i>	*	*	0.25
<i>Pseudomona euroginosa</i>	*	*	0.75
<i>Brucella canis</i>	*	*	0.25
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	*	*	0.50
<i>Haemophilus sp</i>	*	*	0.03
<i>Pasteurella multocida</i>	*	*	0.02
<i>Pasteurella haemolitica</i>	*	*	0.008
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	*	*	0.06
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	*	*	0.20
<i>Bacillus serus</i>	*	*	4.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	*	0.25
<i>Streptococcus sp</i>	*	*	0.12
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	*	*	0.75
<i>Listeria monocytogenes</i>	*	*	0.75
<i>Erysipelotrix sp</i>	*	*	1.75
<i>Mycoplasma sp</i>	*	*	0.06
<i>Actinobacillus sp</i>	*	*	0.25
<i>Bacteroides sp</i>	*	*	0.03
<i>Clostridium perfringens</i>	*	*	1.60
<i>Chlamidia psittaci</i>	*	*	0.50
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.025	0.01	0.25
<i>Mycoplasma dispar</i>	0.05	*	*
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	0.39	0.10	*
<i>Campylobacter coli</i>	0.25	4	*
<i>Haemophilus paragallinarum</i>	0.015	0.001	*
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.25	0.39	*

* - no se tiene información al respecto

Cuadro 2

Halos de inhibición obtenidos de 10 diluciones de enrofloxacin por difusión en agar

REPETICIONES

DILUSION µg/ml	1 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6 mm	7 mm	8 mm	9 mm	10 mm	MEDIA mm	DE
10.00	20.87	21.67	21.99	21.34	23.21	20.61	21.19	21.25	20.64	21.59	21.44	0.7654
5.00	19.36	19.99	18.63	18.24	18.9	18.59	16.77	17.58	15.5	18.12	18.17	1.295
2.50	16.92	16.13	14.1	13.18	16.79	15.05	14.41	15.21	13.44	14.49	14.97	1.3068
1.25	14.62	12.69	13.13	11.06	12.99	12.67	11.2	9.81	11.58	11.85	12.16	1.3461
0.63	7.86	9.31	8.72	8.64	8.25	8.57	8.90	8.75	9.20	8.91	8.172	0.425
0.31	6.99	8.28	6.79	6.99	7.00	6.73	6.92	7.21	6.70	7.08	7.02	0.440
0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 3.
Ensayos de recuperación de enrofloxacin

Concentración agregada (µg/ml)	Concentración obtenida (µg/ml)	Porcentaje de recuperación
5	5.2	104
5	4.9	98
5	4.8	96
5	4.9	98
Promedio	4.95	99
Desviación estandar	0.1732	3.644
8	7.8	97.5
8	8.2	102.5
8	8.1	101.25
8	7.8	97.5
Promedio	7.975	99.687
Desviación estandar	0.2061	0.173
10	10.05	100.5
10	10.1	105
10	9.9	99
10	9.7	97
Promedio	9.937	100.37
Desviación estandar	0.179	3.40
15	14.9	99.33
15	15.2	101.33
15	14.7	98
15	14.9	99.33
Promedio	14.925	99.5
Desviación estandar	0.206	1.374
Media	99.64	
± DE	0.974	

Cuadro 4.

Concentraciones de enrofloxacin sérica en aves, obtenidas a partir de extrapolación en una curva de regresión ajustada del estándar de la eficacia antibacteriana de enrofloxacin por difusión en agar.

Tiempo HORAS	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5		Grupo 6	
	Halo de inhibición (mm)	Extrapolaci on (µg/ml)										
0.41	11.69	1.084	16.024	3.751	15.229	2.23	14.981	2.150	14.847	1.713	14.981	0.704
0.75	11.46	0.926	13.494	1.596	15.334	2.176	12.735	1.202	16.61	2.370	12.735	1.900
1.5	13.47	1.682	12.778	1.404	14.204	1.727	10.754	0.740	17.68	3.207	10.754	2.007
3	14.74	2.088	16.456	2.973	15.67	2.344	12.746	1.170	19.707	3.530	12.746	3.046
6	12.96	1.306	13.246	1.464	12.974	1.232	11.552	0.916	17.838	3.290	11.552	1.806
9	9.82	0.604	10.5	0.700	9.637	0.628	8.585	0.101	18.05	2.670	8.585	0.661
12	9.39	0.238	10.15	0.199	8.89	0.193	8.42	0.096	19.955	3.093	8.42	0.149
24	8.72	0.194	8.01	0.139	0.62	0.089	2.93	0.000	12.435	0.837	2.93	0.000

Cuadro 5
Valores cinéticos obtenidos de las concentraciones séricas de enrofloxacina en aves por medio del
programa PKAnalyst

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
K_{el}	1.87	4.96	5.21	4.16	2.28	1.84
K_{AE}½	1.87	1.47	1.27	1.79	2.1	1.84
K_{AB}½	1.87	3.77	1.11	2.43	1.93	1.84
T_{max1} (horas)	0.83	0.5	0.5	0.5	4.5	4
T_{max2} (horas)	4.5	4	5.5	5	8	5.5
C_{smax1} (µg/ml)	0.9	3.75	2.4	1.5	6.4	3
C_{smax2} (horas)	1.75	3	2.92	1.2	0	0
AUC	13.53	16.60	15.32	6.9	46.810	18.96
AUMC	73.28	70.77	56.44	24.97	284.05	101.13
Residens time	6.41	4.26	3.68	3.58	6.06	5.33
R_{sq}	0.986	0.857	0.940	0.920	0.978	0.965

Cuadro 6.
Estadístico comparativo de las cinéticas de enrofloxacina sérica en aves

COMPARACIÓN entre grupos	Deficiencia en los rangos	SE	O
Para β H = 26.364 con 5 grados de libertad P < 0.005			
3 vs 1	25.80 - 4.00 = 21.80	5.56	3.922
3 vs 5	25.80 - 8.00 = 17.80	5.56	3.203
2 vs 1	25.20 - 8.00 = 17.20	5.56	3.814
2 vs 5	25.20 - 8.00 = 17.20	5.56	3.095
Para $T\frac{1}{2}\beta$ H = 24.887 con 5 grados de libertad P < 0.005			
1 vs 2	27 - 5.10 = 21.90	5.56	3.936
1 vs 3	27 - 5.90 = 21.10	5.56	3.792
Para Cs_{max1} H = 28.032 con 5 grados de libertad P < 0.005			
5 vs 4	28.00 - 3.00 = 25.00	5.56	4.494
5 vs 1	28.00 - 8.00 = 20.00	5.56	3.595
2 vs 4	23.00 - 3.00 = 20.00	5.56	3.595
Para AUC H = 28.338 032 con 5 grados de libertad P < 0.005			
5 vs 4	28.00 - 3.00 = 25.00	5.57	4.491
5 vs 1	28.00 - 8.00 = 20.00	5.57	3.593
3 vs 4	23.00 - 3.00 = 20.00	5.57	3.593
Para Cs_{max2} H = 28.504 con 5 grados de libertad P < 0.005			
5 vs 6	28.00 - 5.05 = 22.50	5.46	4.120
5 vs 1	28.00 - 5.05 = 22.50	5.46	4.120
2 vs 6	23.00 - 5.05 = 17.50	5.46	4.120
2 vs 1	23.00 - 5.05 = 17.50	5.46	4.120
Para T_{max1} H = 25.761 con 5 grados de libertad P < 0.005			
5 vs 6	28.00 - 5.50 = 22.50	5.44	4.136
5 vs 1	28.00 - 5.50 = 22.50	5.44	4.136
Para T_{max2} H = 26.889 con 5 grados de libertad P < 0.005			
5 vs 3	28.00 - 3.00 = 25.00	5.56	4.497
5 vs 1	28.00 - 3.00 = 25.00	5.56	3.598

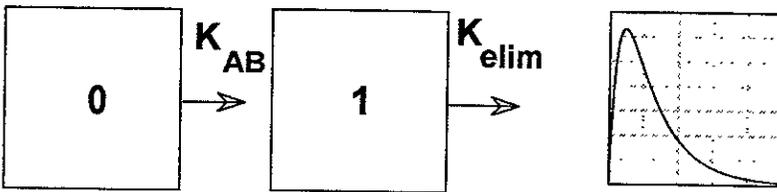
Cuadro 7

Resistencias bacterianas a enrofloxacin

Especie	Origen	Nº de aislamiento	GM1	MIC ₅₀	MIC ₉₀	% de resistencia
Campylobacter <i>sp.</i>	Queretaro	11	0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 1.87, 1.25, 2.5, 2.5, 3.75	0.23	1.87	28
	Celaya	12	0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 1.87, 1.87, 2.5, 2.5, 3.75, 1.87	0.23	1.87	35
	Torreón	9	0.23, 0.31, 0.31, 0.31, 1.87, 1.87, 2.5, 2.5, 2.5	0.31	1.87	30
	Morelos	8	0.31, 0.23, 0.23, 0.23, 0.62, 1.87, 2.50, 3.75	0.23	1.87	29
	Guadalajara	7	0.23, 0.23, 0.31, 2.5, 1.87, 2.5, 2.5	0.31	1.87	31
	Queretaro	9	0.11, 0.11, 0.15, 0.23, 0.62, 0.93, 2.5, 2.5, 2.5	0.23	0.87	35
	Celaya	8	0.23, 0.23, 0.23, 0.23, 1.25, 1.25, 2.5, 1.87	0.23	1.25	29
Escherichia <i>coli</i>	Torreón	10	0.23, 0.15, 0.15, 0.15, 0.23, 1.25, 1.87, 2.5, 2.5, 3.75	0.23	1.87	32
	Morelos	9	0.23, 0.23, 0.23, 0.31, 1.25, 1.25, 2.5, 2.5, 3.75	0.31	1.25	30
	Guadalajara	9	0.31, 0.31, 0.23, 0.23, 1.87, 2.5, 1.87, 2.5, 3.75	0.31	1.87	26

Diluciones realizadas: 5, 3.75, 2.5, 1.875, 1.25, 0.9375, 0.625, 0.46875, 0.3125, 0.234375, 0.15625, 0.1171875, 0.078125, 0.05915625, 0.0390625.

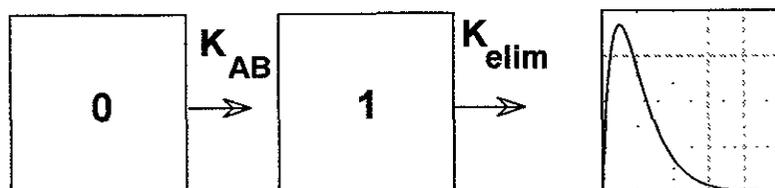
11. ANEXOS

PK Analyst Model #3***One Compartment with First-Order Input and First-Order Output******Independent Variable:*** Time***Dependent Variable:*** Concentration***Parameters:*** Volume, Dose, K_{elim} , K_{AB} ***Calculated Quantities:*** AUC, K_{elim_half} , K_{AB_half} , T_{Conc_Max} ,
Conc_Max, AUMC, Residence_time,
AUC_to_last_T, AUMC_to_last_T,
Residence_time_to_last_T***Equation:***

$$\text{Concentration}(\text{Time}) = \frac{\text{Dose} \cdot K_{AB}}{\text{Volume} (K_{AB} - K_{elim})} (e^{-K_{elim} \cdot \text{Time}} - e^{-K_{AB} \cdot \text{Time}})$$

Synopsis:

This model allows the elimination rate, K_{elim} , the absorption rate, K_{AB} , and the ratio Dose/Volume to be found given a number of measurements of the concentration in the compartment over a period of time. It also reports the area under the curve, AUC, the half life of elimination, K_{elim_half} , the half life of the absorption, K_{AB_half} , the time when the concentration reaches its maximum, T_{Conc_Max} , the maximum concentration, Conc_Max, the area under the moment curve, AUMC, the residence time, Residence_time, the area under the curve to the last time point, AUC_to_last_T, the area under the moment curve to the last time point, AUMC_to_last_T, and the residence time to the last time point, Residence_time_to_last_T.

PK Analyst Model #5***One Compartment with Equal First-Order Input and First-Order Output***

Independent Variable: Time

Dependent Variable: Concentration

Parameters: Volume, Dose, K_{AE}

Calculated Quantities: AUC , K_{AE_half} , T_{Conc_Max} , $Conc_Max$,
 $AUMC$, $Residence_time$,
 $AUC_to_last_T$, $AUMC_to_last_T$,
 $Residence_time_to_last_T$

Equation:

$$Concentration(Time) = \frac{Dose \cdot K_{AE} \cdot Time}{Volume} e^{-K_{AE} \cdot Time}$$

$$\text{where } K_{AE} = K_{AB} = K_{elim}$$

Synopsis:

This model allows the elimination rate or absorption rate (the two are equal in this case), K_{AE} , and the ratio Dose/Volume to be found given a number of measurements of the concentration in the compartment over a period of time. It also reports the area under the curve, AUC , the half life of the elimination or absorption, K_{AE_half} , the time at which the maximum concentration is reached, T_{Conc_Max} , the maximum concentration, $Conc_Max$, the area under the moment curve, $AUMC$, the residence time, $Residence_time$, the area under the curve to the last time point, $AUC_to_last_T$, the area under the moment curve to the last time point, $AUMC_to_last_T$, and the residence time to the last time point, $Residence_time_to_last_T$.

ANEXO 3

Muestras 3 entradas de Enrofloxacin

Fecha de Análisis: 14 y 15 Enero 2000

F 8IP6025 AMB Madex
E 8BP5057 Q Sintetica CHEMC
E 8KP6196 Moleculas Finas

Cromatograma	Título	Pico	TR	Area	Altura	Prom	S	%RSD	mcg/ml	
A00D-GSL0051	STD CIPROFLOX	2	Ciprofloxacino	20 55556	529 6747	8.795535	9 12	0 46	5 06	15 3
A00D-GSL0051	STD CIPROFLOX	2	Enrofloxacin							
A00D-GSL0052	STD CIPROFLOX	2	Ciprofloxacino	21 33333	554 4531	9 448659				
A00D-GSL0052	STD CIPROFLOX	2	Enrofloxacin							

										%	
A00D-GSL0053	F 8IP6025		Ciprofloxacino	20 47556	5 518993	0 0984425	0 10	0 03	4 72	0 17	0 33
A00D-GSL0053	E 8IP6025		Enrofloxacin	30 39111	1999 679	22 29222					
A00D-GSL0054	E 8IP6025		Ciprofloxacino	20 85778	6 547938	0 1052343					
A00D-GSL0054	E 8IP6025		Enrofloxacin	30 68889	2093 965	24 01765					

A00D-GSL0055	E 8BP5057		Ciprofloxacino	20 57333	3 043652	0 0631809	0 06	0 00	1 99	0 11	0 21
A00D-GSL0055	E 8BP5057		Enrofloxacin	30 53333	1977 652	23 05					
A00D-GSL0056	E 8BP5057		Ciprofloxacino	20 91556	3 263791	0 0649314					
A00D-GSL0056	E 8BP5057		Enrofloxacin	30 46222	2067 972	24 49181					

A00D-GSL0057	E 8KP6196		Ciprofloxacino								
A00D-GSL0057	E 8KP6196		Enrofloxacin	30 42667	2021 875	22 99228					
A00D-GSL0058	E 8KP6196		Ciprofloxacino								
A00D-GSL0058	E 8KP6196		Enrofloxacin	30 45778	1996 607	22 52361					

Resultados

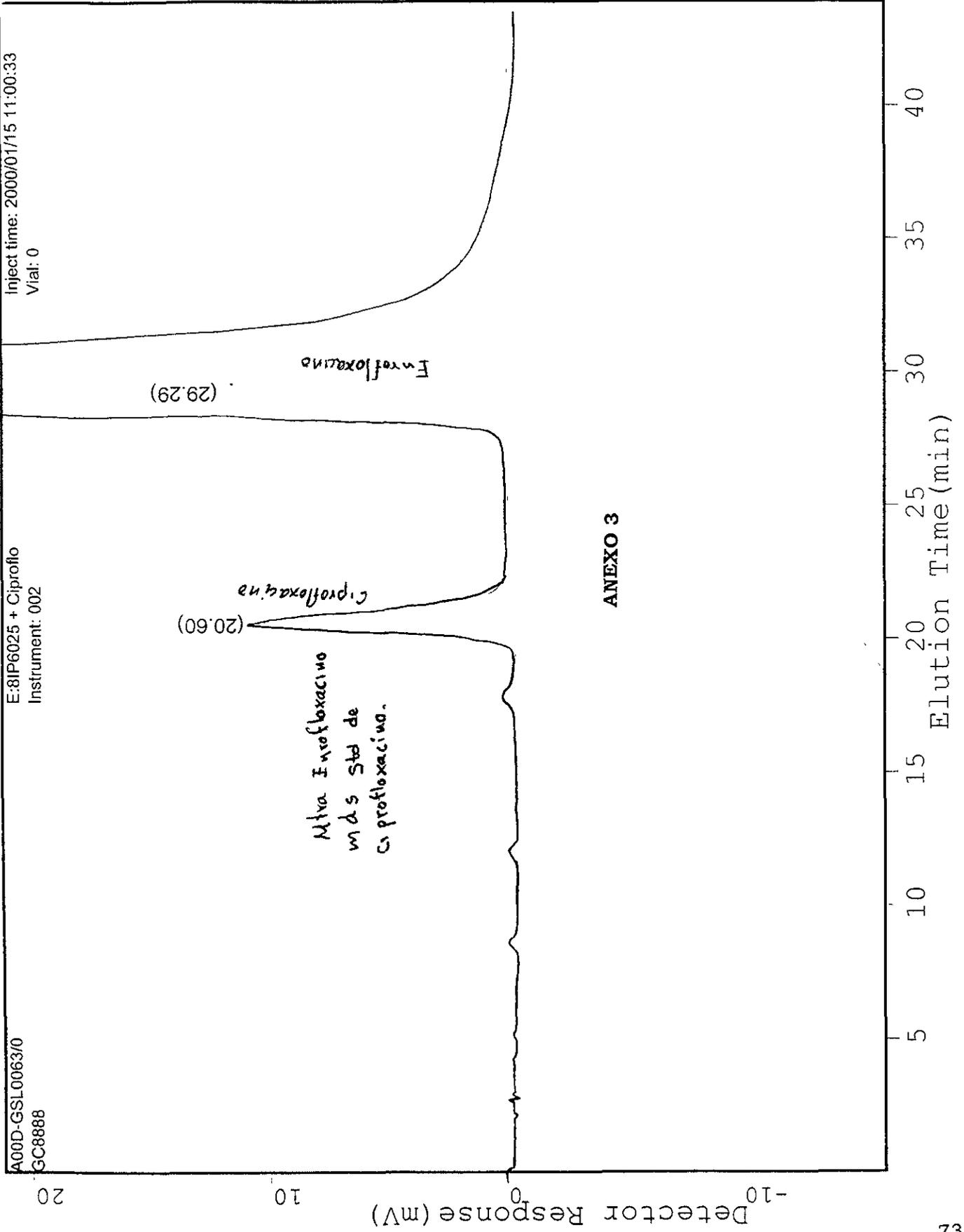
Se analizaron las muestras de Enrofloxacin descritas antes, así como Estándar de Ciprofloxacino y Enrofloxacin (std "in-house") por cromatografía de líquidos, empleamos el método para valorar Ciprofloxacino MP, el cual señala a los dos picos de interés.

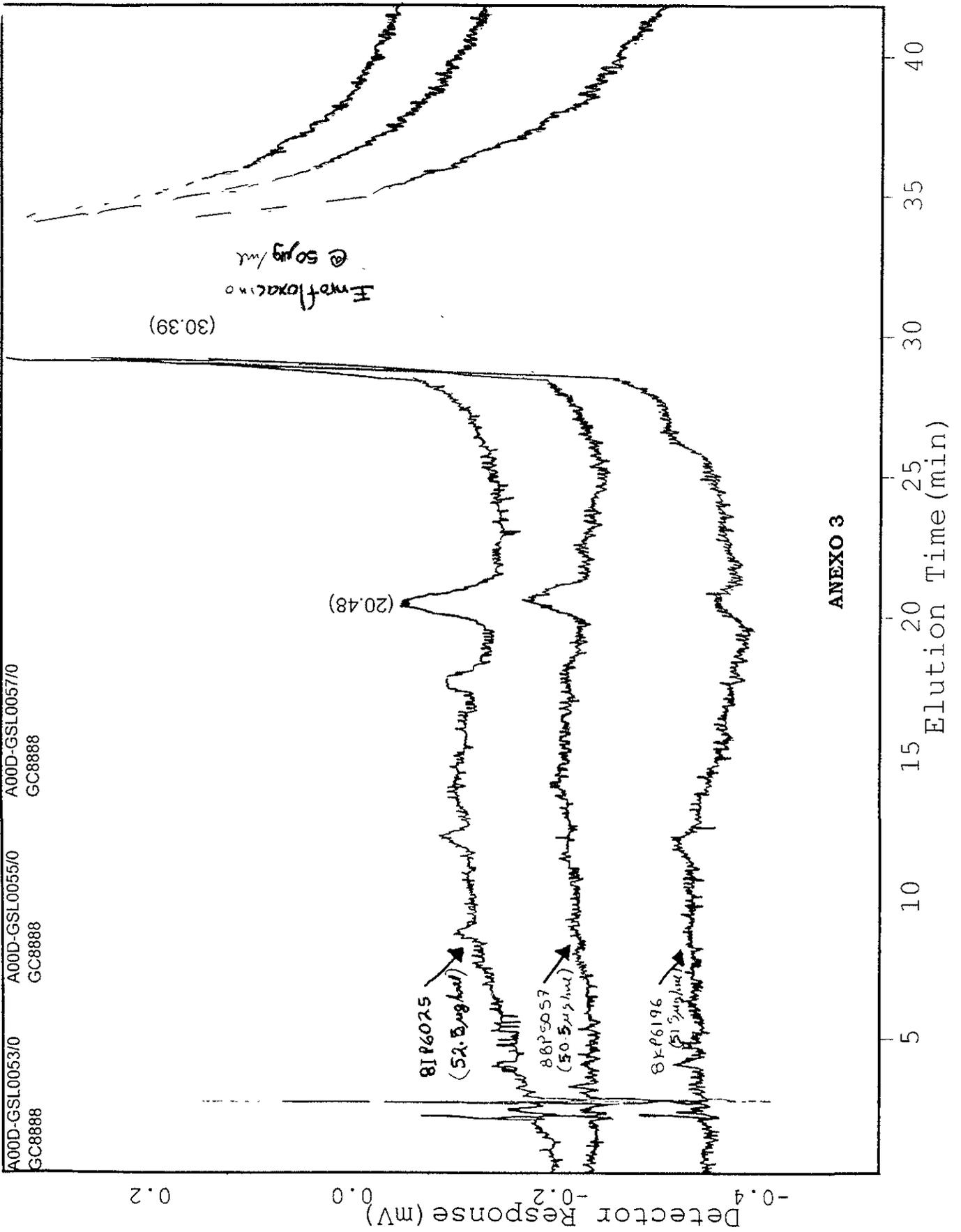
Todas las muestras de Enrofloxacin presentaron una pequeña señal en el tiempo de respuesta del Ciprofloxacino, de lo cual se concluye que contiene Ciprofloxacino en cada una. Se añadió estándar de Ciprofloxacino a la solución de la muestra (8IP6025) observándose incremento en la respuesta del pico de Ciprofloxacino, lo cual confirma que se trata de este compuesto.

La cuantificación de Ciprofloxacino en cada muestra se hizo utilizando las alturas de la señal de respuesta, ya que es bastante pequeña para calcular las áreas. El resultado cuantificado no se obtuvo con un método válido y se realizó con una señal de aproximadamente 10 veces el nivel de ruido, lo cual no es recomendable, el valor se reporta como un dato aproximado.

Queda a sus órdenes para cualquier duda.

Dr. Carlos Soto
Desarrollo Analítico



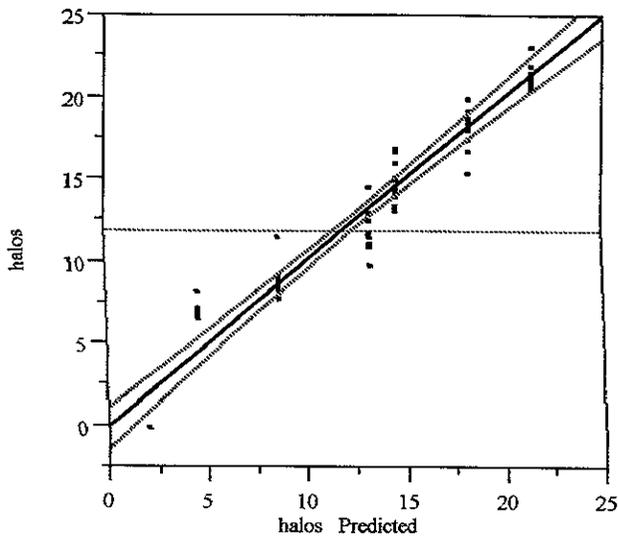


Anexo 4.
Relacion de pesos de las aves / dosis. Por grupo

GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4		GRUPO 5		GRUPO 6	
Peso(kg)	Dosis(ml)	Peso(kg)	Dosis(ml)	Peso(kg)	Dosis(ml)	Peso(kg)	Dosis(ml)	Peso(kg)	Dosis (ml)	PESO(kg)	Dosis(ml)
0.832	8.32	0.723	3.615	0.843	4.215	0.871	8.71	0.71	3.55	0.703	7.03
0.79	7.9	0.578	2.89	0.758	3.79	0.723	7.23	0.996	4.98	0.702	7.02
0.846	8.46	0.75	3.75	0.824	4.12	0.886	8.86	0.856	4.28	0.71	7.1
0.861	8.61	0.64	3.2	0.68	3.4	1	10	0.848	4.24	0.82	8.2
0.759	7.59	0.886	4.43	0.702	3.51	0.63	6.3	0.703	3.515	0.827	8.27
0.866	8.66	0.871	4.355	0.871	4.355	0.64	6.4	0.68	3.4	0.65	6.5
0.758	7.58	0.908	4.54	0.52	2.6	0.899	8.99	0.702	3.51	0.64	6.4
0.824	8.24	0.82	4.1	0.82	4.1	0.843	8.43	0.71	3.55	0.65	6.5
0.68	6.8	0.899	4.495	0.899	4.495	0.82	8.2	0.827	4.135	0.861	8.61
0.702	7.02	0.843	4.215	0.843	4.215	0.745	7.45	0.99	4.95	0.835	8.35
0.827	8.27	0.745	3.725	0.745	3.725	0.79	7.9	0.61	3.05	0.846	8.46
0.71	7.1	0.59	2.95	1.014	5.07	0.832	8.32	0.871	4.355	0.61	6.1
0.99	9.9	0.832	4.16	0.996	4.98	0.849	8.49	0.68	3.4	0.62	6.2
0.856	8.56	0.79	3.95	0.99	4.95	0.955	9.55	0.63	3.15	0.832	8.32
0.703	7.03	0.849	4.245	0.856	4.28	0.866	8.66	0.67	3.35	0.827	8.27
0.848	8.48	0.861	4.305	0.848	4.24	0.861	8.61	0.63	3.15	0.824	8.24
0.68	6.8	0.759	3.795	0.827	4.135	0.849	8.49	0.843	4.215	0.79	7.9
0.762	7.62	0.57	2.85	0.71	3.55	0.824	8.24	0.824	4.12	0.77	7.7
0.768	7.68	0.758	3.79	0.71	3.55	0.827	8.27	0.82	4.1	0.768	7.68
0.704	7.04	0.824	4.12	0.703	3.515	0.79	7.9	0.758	3.79	0.762	7.62
0.628	6.28	0.68	3.4	0.702	3.51	0.759	7.59	0.68	3.4	0.759	7.59
0.899	8.99	0.702	3.51	0.68	3.4	0.758	7.58	0.702	3.51	0.71	7.1
0.584	5.84	0.827	4.135	0.68	3.4	0.702	7.02	0.82	4.1	0.721	7.21
0.914	9.14	0.7	3.5	0.702	3.51	0.68	6.8	0.871	4.355	0.733	7.33
0.68	6.8	0.71	3.55	0.703	3.515	0.68	6.8	0.908	4.54	0.74	7.4
0.762	7.62	0.856	4.28	0.71	3.55	0.71	7.1	0.899	4.495	0.758	7.58
0.768	7.68	0.703	3.515	0.82	4.1	0.703	7.03	0.843	4.215	0.704	7.04
0.704	7.04	0.848	4.24	0.827	4.135	0.702	7.02	0.745	3.725	0.703	7.03
0.692	6.92	0.68	3.4	0.75	3.75	0.82	8.2	0.6	3	0.702	7.02
0.721	7.21	0.702	3.51	0.856	4.28	0.827	8.27	0.996	4.98	0.7	7
0.77	7.7	0.827	4.135	0.871	4.355	0.848	8.48	0.99	4.95	0.692	6.92
0.733	7.33	0.71	3.55	0.886	4.43	1	10	0.856	4.28	0.68	6.8
0.835	8.35	0.73	3.65	0.899	4.495	0.62	6.2	0.848	4.24	0.68	6.8
0.7	7	0.72	3.6	0.72	3.6	0.65	6.5	0.71	3.55	0.658	6.58
0.658	6.58	1	5	0.7	3.5	0.908	9.08	0.75	3.75	0.628	6.28
0.74	7.4	0.886	4.43	0.64	3.2	0.899	8.99	0.827	4.135	0.63	6.3
0.76	7.6	0.871	4.355	0.63	3.15	0.886	8.86	0.703	3.515	0.7	7
0.945	9.45	0.908	4.54	0.63	3.15	0.871	8.71	0.68	3.4	0.75	7.5
0.62	6.2	0.82	4.1	0.85	4.25	0.856	8.56	0.68	3.4	0.62	6.2
0.85	8.5	0.899	4.495	0.578	2.89	0.61	6.1	0.702	3.51	0.580	5.8

ANEXO 5

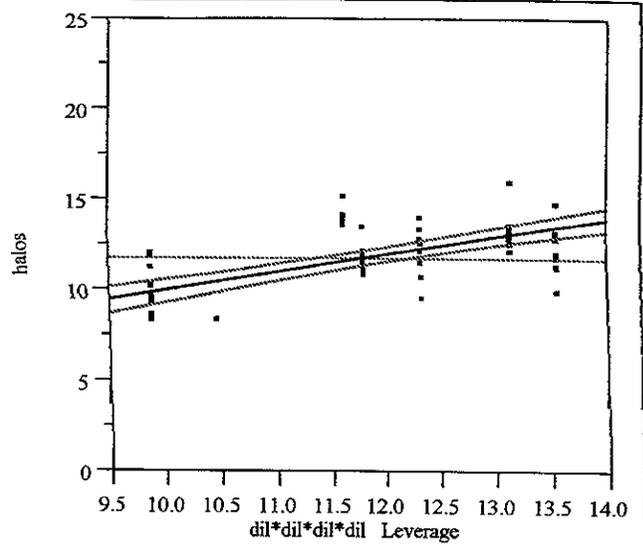
Whole-Model Test



Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	3013.1858	753.296	272.2345
Error	65	179.8606	2.767	Prob>F
C Total	69	3193.0464		<.0001

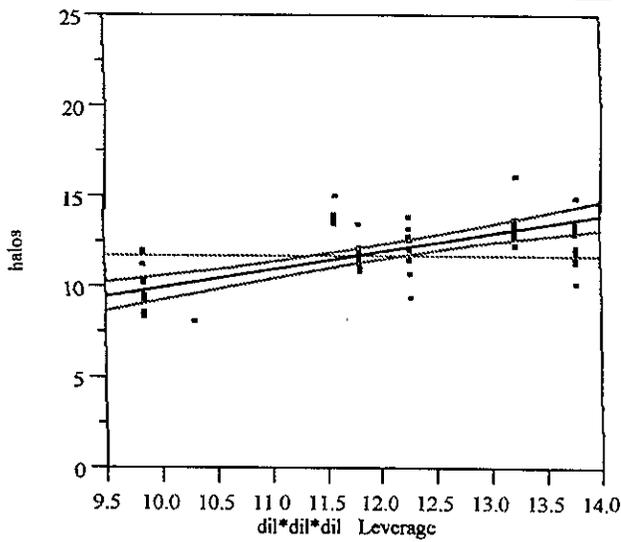
dil*dil*dil*dil



Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob>F
106.31169	38.4201	1	<.0001

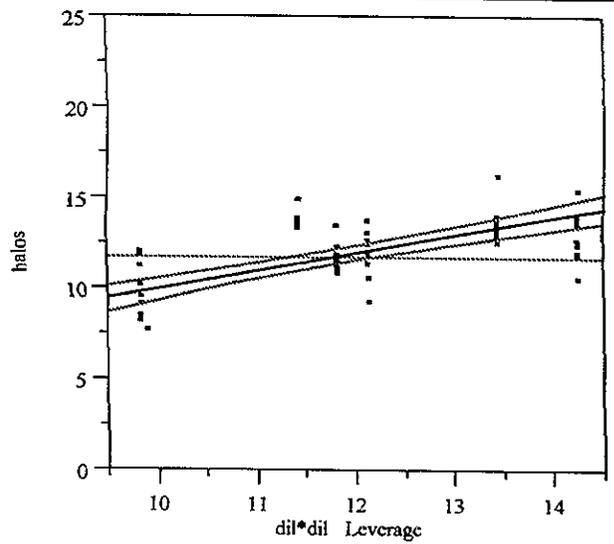
dil*dil*dil



Effect Test

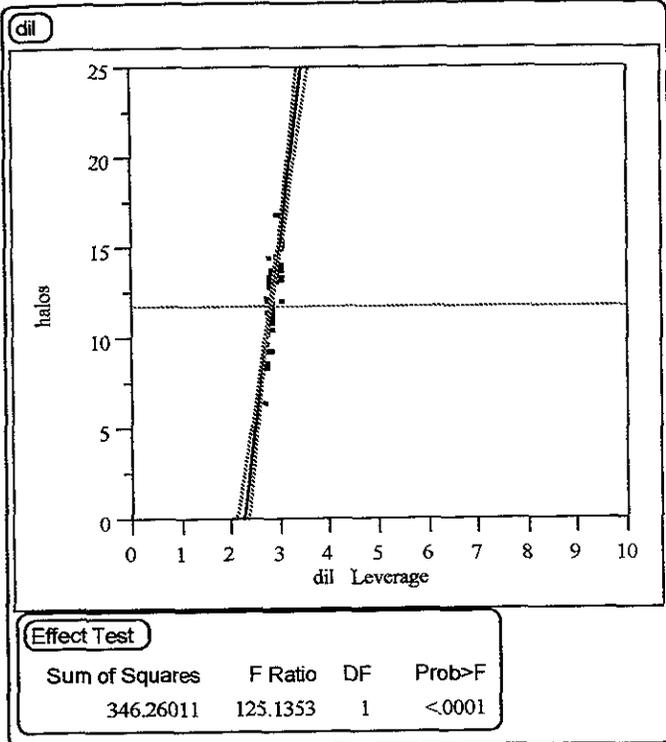
Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob>F
122.39852	44.2337	1	<.0001

dil*dil



Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob>F
165.02345	59.6380	1	<.0001



Response: halos

Summary of Fit	
RSquare	0.943671
RSquare Adj	0.940205
Root Mean Square Error	1.663456
Mean of Response	11.831
Observations (or Sum Wgts)	70

Lack of Fit				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack of Fit	2	116.65100	58.3255	58.1321
Pure Error	63	63.20961	1.0033	Prob>F
Total Error	65	179.86061		<.0001
				Max RSq
				0.9802

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-0.991062	0.636418	-1.56	0.1243
dil*dil*dil*dil	-0.087503	0.014117	-6.20	<.0001
dil*dil*dil	1.616483	0.243049	6.65	<.0001
dil*dil	-9.253719	1.19827	-7.72	<.0001
dil	20.6345	1.844608	11.19	<.0001

Effect Test					
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob>F
dil*dil*dil*dil	1	1	106.31169	38.4201	<.0001
dil*dil*dil	1	1	122.39852	44.2337	<.0001
dil*dil	1	1	165.02345	59.6380	<.0001
dil	1	1	346.26011	125.1353	<.0001

LINEARITY

A linear relationship should be evaluated across the range (see section 3) of the analytical procedure. It may be demonstrated directly on the drug substance (by dilution of a standard stock solution) and/or separate weighings of synthetic mixtures of the drug product components, using the proposed procedure. The latter aspect can be studied during investigation of the range.

Linearity should be evaluated by visual inspection of a plot of signals as a function of analyte concentration or content. If there is a linear relationship, test results should be evaluated by appropriate statistical methods, for example, by calculation of a regression line by the method of least squares. In some cases, to obtain linearity between assays and sample concentrations, the test data may need to be subjected to a mathematical transformation prior to the regression analysis. Data from the regression line itself may be helpful to provide mathematical estimates of the degree of linearity.

The correlation coefficient, y-intercept, slope of the regression line and residual sum of squares should be submitted. A plot of the data should be included. In addition, an analysis of the deviation of the actual data points from the regression line may also be helpful for evaluating linearity.

Some analytical procedures, such as immunoassays, do not demonstrate linearity after any transformation. In this case, the analytical response should be described by an appropriate function of the concentration (amount) of an analyte in a sample.

For the establishment of linearity, a minimum of 5 concentrations is recommended. Other approaches should be justified.

Anexo 7

pH del contenido digestivo en aves con alimento en el aparato digestivo

Region del aparato digestivo	pH
Buche	4.57
Proventriculo	4.40
Molleja	2.60
Duodeno	5.76-6.01
Yeyuno	5.78-5.90
Ileon	6.27-6.42
Recto o colon	6.26
Ciego	5.71
Bilis	5.88

Anexo 8

Enzimas del aparato digestivo de las gallinas

Organismo y secreción	Enzimas
Saliva	Amilasa
Proventriculo (jugo gástrico)	Pepsina
Molleja y extractos	Pepsina
Tejido o jugo intestinal puro	Amilasa Invertasa Tripsina
Pancreas (jugo pancreático)	Amilasa Invertasa Tripsina Lipasa
Bilis	Amilasa

ANEXO 9

Longitudes del aparato digestivo en aves de dos edades distintas.

Parte media	Edad	
	20 días (cm)	1½ años (cm)
Aparato digestivo completo	8.5	210
Ángulo del pico al buche	7.5	20
Ángulo del pico al proventrículo	11.5	53
Duodeno	12	20
Ileon y yeyuno	49	120
Ciego Recto	5	17.5
	4	11.25