

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

INFLUENCIA DEL AGUA DURA EN LA
BIODISPONIBILIDAD DE LA ENROFLOXACINA EN
POLLOS

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
RITA AGUILERA JIMENEZ

TUTOR: MVZ. HECTOR S. SUMANO LOPEZ
COMITE TUTORAL: MVZ. RENE ROSILES MARTINEZ
QFB. MARIA JOSEFA BERNAD

MEXICO, D. F.

2005

m343547



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

A mis Abuelos Félix e Isabel con todo mi amor y respeto.

A mi Mamá Irene Jiménez Barrera por su ejemplo y cariño

A mis hermanas Ara y Mary por su comprensión y apoyo; las quiero mucho.

A mis sobrinos Mario y Walter por creer en mí

A mi Papá

A mi tía Rosa

A Paty

A mis hermanos Aure, Beto, Alex, Pepe, Rafa, Dana, Jazmín y Marcos por todos los momentos lindos que vivimos

A Javier

Agradecimientos

Al CONACyT por brindarme la oportunidad de seguir con mis estudios.

Al mis tutores: Dr. Héctor Sumano López por su confianza y por brindarme la oportunidad de trabajar con él, al Dr. René Rosiles Martínez por su ayuda incondicional y a la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad por recibirme siempre tan cordial.

A Lilia Gutiérrez Olvera por ser una excelente amiga y por guiarme en mi aprendizaje.

Al Dr Luis Ocampo Camberos por su ayuda, confianza y amistad.

INDICE

Tema	Página
I Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Características fisicoquímicas de la enrofloxacin	4
1.3. Farmacodinamia	5
1.4. Espectro antimicrobiano de la enrofloxacin	5
1.5. Farmacocinética de la enrofloxacin en aves administrada por vía	6
1.6. Biodisponibilidad	6
1.7. Vías de administración en aves	7
1.8. Calidad del agua de bebida	8
II Justificación	11
III Hipótesis	12
IV Objetivos	12
V Materiales y métodos	
5.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antimicrobiano de la enrofloxacin	13
5.1.1. Preparación de agua dura sintética por el método M/29 descrito por la Organización Mundial de la Salud	13
5.1.2. Cálculo matemático de dureza	13
5.1.3. Métodos para la cuantificación de la dureza	14
5.1.4. Cuantificación de Ca^{2+} y Mg^{2+} por absorción atómica	14
5.1.5. Preparación de las muestras de agua muy dura para su análisis por absorción atómica	15
5.1.6. Dilución de la enrofloxacin en agua muy dura preparada en laboratorio y agua desmineralizada	15
5.1.7. Preparación del medio de cultivo	16
5.1.8. Preparación del estándar bacteriano y siembra de bacteria	16
5.2 Evaluación <i>in situ</i> del efecto antimicrobiano de la enrofloxacin	17
5.2.1. Preparación del intestino	17

Tema	Página
5.3. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antibiótico de la enrofloxacin	18
5.3.1. Dosificación de las aves, obtención y procesamiento de muestras	18
6.1. Evaluación <i>in vitro</i>	21
6.1.1. Lecturas de absorción atómica para comprobar la cantidad de Ca^{2+} en el agua dura.	21
6.1.2. Determinación de Mg^{2+} en agua dura preparada.	23
6.1.3. Cálculos para ajustar la cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} para obtener agua muy dura (195 ppm)	24
6.1.4. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de la enrofloxacin en aguas muy duras (195 ppm de $CaCO_3$) y en agua desmineralizada frente a cultivos de <i>E. coli</i> .	26
6.1.5 Conclusión estadística del ensayo <i>in vitro</i>	28
6.2. Evaluación <i>in situ</i> : determinación de la absorción de la	29
6.3. Evaluación de la absorción de la enrofloxacin diluida en agua	30
6.3.1. Ajuste de sales para obtener agua con diferentes grados de dureza.	31
6.4. Evaluación de la administración estratégica de Ca^{2+} y	31
VII Discusión	31
VIII Bibliografía	36
Anexo A Cuadros y Figuras	
Anexo B Sumano L.H, Gutiérrez OL, Aguilera JR, Rosiles MR, Gracia M.J, Bernard BMJ. Influence of hard water on bioavailability of enrofloxacin in chickens. Poult Sci: 2004; 83(5):726-31	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Anexo C

Aguilera R, Gutiérrez OL, Sumano LH. Enhancement of enrofloxacin serum antibacterial activity in calcium primed broilers. En revision. Carta de aprobación de la Revista Próximo a ser publicado en el Journal of Veterinary Research.

Lista de cuadros

Cuadro	Título	Anexo A
1	Valores farmacocinéticos de enrofloxacin en aves a diferentes dosis por vía oral por varios autores.	
2	Calidad del agua de bebida para pollo de acuerdo a distintos autores.	
3	Tipos de dureza y sales presentes	
4	Clasificación de la dureza de acuerdo a la dureza expresada en ppm de CaCO_3	
5	Cuantificación de calcio por absorción atómica en muestras preparadas de agua muy dura (371 mg/L)	
6	Cuantificación de magnesio por absorción atómica en muestras preparadas de agua muy dura (371 mg/L)	
7	Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y agua muy dura.	
8	Medida de halos de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> .	
9	Fracción absorbida y no absorbida de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada.	
10	Fracción absorbida y no absorbida de enrofloxacin diluida en agua muy dura.	
11	Cantidad de sales ajustadas de acuerdo a las lecturas obtenidas por absorción atómica para producir agua dura con diferentes grados de dureza así como grupo asignado para su evaluación <i>in vivo</i> .	

Figura	Lista de figuras Título	Anexo A
1	Esquema de la cámara de órganos aislados.	
2	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de la enrofloxacin diluida en agua muy dura y agua desmineralizada.	
3	Actividad antimicrobiana de la enrofloxacin diluida en solución Tyrode, en agua muy dura y agua desmineralizada.	
4	Curva estándar de enrofloxacin diluida en solución Tyrode con un porcentaje de recuperación mayor al 98% y un error intraensayo menor al 0.2%.	
5	Curva de actividad antimicrobiana expresada en $\mu\text{g/ml}$ de enrofloxacin diluida en agua muy dura y agua desmineralizada en muestras obtenidas a los 15, 30 y 45 min., 1, 1.5, 2, 2.5, y 3 h.	

Resumen

A fin de evaluar la influencia del agua dura sobre la biodisponibilidad de la enrofloxacin en pollos se realizaron una serie de estudios que se mencionan a continuaci3n.

Se prepar3 agua dura de acuerdo con est3ndares internacionales como los establecidos por la Organizaci3n Mundial de la Salud (WHO/M29), utilizando CaCl_2 y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ajustando la cantidad de 3stas sales de acuerdo a los resultados obtenidos por el an3lisis de muestras por absorci3n at3mica. Con esto se logr3 obtener agua de diferentes durezas: blanda de 0-30 mg/L, moderadamente blanda 31-60 mg/L; moderadamente dura 61-120 mg/L; dura 121-180 mg/L y muy dura >181 mg/L. Se realizaron ensayos *in vitro* con enrofloxacin diluida en agua muy dura para evaluar la modificaci3n del efecto antimicrobiano en cultivos bacterianos y se encontr3 que hay un aumento de la actividad de la enrofloxacin frente a cultivos de *E. coli*. Posteriormente se realizaron estudios *in situ* con duodeno aislado en c3maras especiales que mantuvieron viable el 3rgano durante 3 horas; se evalu3 la cantidad de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y agua muy dura, que era capaz de atravesar el tejido intestinal, simulando el proceso de absorci3n. A pesar de que *in vitro*, el agua dura tiende a mejorar la actividad antimicrobiana, *in situ* disminuy3 la tasa de absorci3n de la enrofloxacin. En estudios con animales (*in vivo*) se estableci3 que la absorci3n de la enrofloxacin es progresivamente inhibida a medida que aumenta la dureza del agua, probablemente debido a la formaci3n de complejos de coordinaci3n con estequiometria 2:1 de enrofloxacin con calcio que se cree son poco aptos para atravesar membranas. Dado que el calcio aumenta la eficacia *in vitro*, pero disminuye la biodisponibilidad, se realiz3 otro ensayo en el que se administro borogluconato de calcio y enrofloxacin bajo diferentes esquemas de dosificaci3n. Los resultados indican otra vez que el calcio interfiere con la absorci3n, pero mejora la actividad antimicrobiana en el plasma una vez que se permite la absorci3n de calcio. El significado cl3nico de la actividad antimicrobiana plasm3tica aumentada deber3 evaluarse en campo antes de que se pueda recomendar esta pr3ctica como promotora del efecto antimicrobiano de la enrofloxacin.

Palabras clave: enrofloxacin, calcio, absorci3n, eficacia.

Abstract

In order to evaluate the influence of hard-water on the bioavailability of enrofloxacin in chicken, a series of study-trials were carried out as follows. Hard water was prepared as directed by international standards (WHO/M29). Then the added amount of calcium chloride and magnesium chloride was corrected according to the amounts of calcium obtained through atomic absorption analysis. Hence, hard water of fixed and constant calcium and magnesium concentration could be obtained. Using the referred hard water, an *in situ* set of tests were done in chicken duodenum to evaluate the influence of hard water on the absorption of enrofloxacin. During this analysis, it became clear that hard-water increases *in vitro* antibacterial activity of enrofloxacin but, this same water reduced absorption of this drug. Having these evidences as background, it was established *in vivo* that the harder the water, the more pronounced inhibition of enrofloxacin absorption from the chickens gut. Evidence gather allows the speculation that absorption of enrofloxacin is impaired because the formation of calcium-enrofloxacin dimmers, that are postulated to be less capable of undergoing absorption from this site. However, because the presence of calcium increases the *in vitro* antibacterial activity of enrofloxacin, another trial was designed to evaluate the influence of administering calcium borogluconate first, and when the calcium salt had been absorbed (two hours later) to evaluate whether or not the antibacterial activity of enrofloxacin in plasma could be enhanced. Results indicate again that calcium interferes with absorption of enrofloxacin but improves its antibacterial activity in plasma when a time gap is allowed between calcium absorption and enrofloxacin administration. The clinical meaning of this drug interaction must be evaluated in field bacterial disease outbreaks before the sequential administration of these drugs could be recommended for clinical purposes.

Key words: enrofloxacin, absorption, bioavailability, efficacy.

INFLUENCIA DEL AGUA DURA EN LA BIODISPONIBILIDAD DE LA ENROFLOXACINA EN POLLOS

I. Introducción

1. Antecedentes

En las dos últimas décadas no se han generado nuevas familias de agentes antibacterianos destinados para veterinaria. Se menciona que es poco viable la introducción al mercado de nuevos principios activos debido al costo que implica su desarrollo tecnológico y cumplir con todas las exigencias que se han impuesto en el mundo por los principales órganos regulatorios como la Food and Drug Administration (FDA), la European Medicines Agency (EMA), el Codex Alimentarius de la World Health Organization (WHO). El último antibacteriano aceptado para su uso en animales productores de alimento fue la enrofloxacin (1).

Hace más de veinte años se introdujo a México y a gran parte de Latinoamérica, la enrofloxacin. Este fármaco pertenece al grupo de las fluoroquinolonas y se considera uno de los antibacterianos más potentes descubiertos y utilizados a la fecha en medicina veterinaria (1). Las fluoroquinolonas son un grupo de antibacterianos sintéticos estructuralmente relacionados; su molécula base es el ácido nalidixico con su núcleo básico, el 4-ácido quinolónico (2). La flumequina fue el primer fármaco fluorado de este grupo, aprobado en México y en la mayor parte del mundo para uso veterinario en el tratamiento de enfermedades bacterianas en bovinos, caninos, caprinos, cerdos, pollos y pavos (3). La flumequina, la enrofloxacin y otras denominadas fluoroquinolonas relacionadas comparten entre sí, la característica de poseer un grupo flúor en la posición 6 (2), pero las fluoroquinolonas más modernas tienen un grupo piperazinilo o similar en la posición 7, lo que les confiere mejores características farmacocinéticas que la flumequina (3). Por su potencia *in vitro* y por sus características farmacocinéticas la enrofloxacin es el

principal exponente de este grupo y en México es uno de los antibacteriano más usados en avicultura (4).

A pesar de los 20 años de uso que tiene en México y Latinoamérica, existen diferentes corrientes de pensamiento en cuanto a la conveniencia de su utilización en avicultura (4). Países como Estados Unidos sostienen que el uso de la éste fármaco puede aumentar la tasa de resistencia de bacterias clave para la salud pública (5), entre las que destacan cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella sp* y *Campylobacter sp* (1,4). Sin embargo, datos generados en los últimos 3 años en ese mismo país, muestran que aunque la resistencia del *Campylobacter sp* ha aumentado, las infecciones en humanos provocadas por éste microorganismo han disminuido considerablemente a pesar de que el uso de enrofloxacin en aves ha ido inevitablemente en aumento (6). Esto ha sido presentado como argumento de que el uso de fluoroquinolonas en veterinaria no está promoviendo la aparición de problemas de resistencia de patógenos clave en salud pública.

Inicialmente, la enrofloxacin se administró a dosis de 5 mg/kg/día usando una presentación al 5% y actualmente se recomienda a dosis de 10 mg/kg/día con una presentación comercial al 10% para lograr una concentración en el agua de bebida al 0.1%. lo que en contraste a lo dicho, sugiere la aparición de resistencias bacterianas (4). Es posible que parte del problema de aparición de cepas resistentes se deba a la incapacidad de los veterinarios para lograr concentraciones plasmáticas máximas, ya que se sabe que es necesario lograr niveles pico máximos con este medicamento denominado concentración-dependiente (7). Así pues se puede apuntar que más que un problema del fármaco en sí, es su mal manejo lo que puede limitar su vida útil en veterinaria. Existen datos que sugieren que en condiciones ideales para la aparición de variedades resistentes, sólo una de cada 1×10^{14} bacterias es potencialmente una mutante que puede modificar el sitio de acoplamiento de la enrofloxacin en la enzima topoisomerasa II y/o IV o bien presentar una actividad importante de las denominadas bombas de eflujo que expulsan al fármaco de la bacteria (8). Sin embargo, la resistencia a nivel clínico no parece depender de la transmisión de plásmidos de resistencia, lo que ha limitado la diseminación de cepas resistentes (9).

Aunque en teoría la tasa de generación de cepas de resistencia para enrofloxacin es baja, existen factores que pueden calificarse como determinantes para la generación de dichas cepas, por ej: la proliferación de preparados de dudosa calidad **(5,10)**, así como el mal manejo del fármaco en campo **(10, 11)**. Como se ha comentado, se ha demostrado que para que la enrofloxacin tenga una mayor eficacia, se les debe medicar lo más parecido a una forma bolo **(4,7, 12)**.

Con esta práctica se pretende lograr un valor especialmente elevado de la concentración plasmática máxima (C_{max}) en el menor tiempo posible (T_{max}) **(11, 12, 13)**: se sugiere incluso, elevar al 0.2% la concentración en el tinaco mediante su vaciado a la mitad, para que se logre con mayor seguridad el efecto de dosis bolo, esto sin aumentar los 10 mg/kg. Aún con estas recomendaciones, lograr una dosis bolo ideal, no siempre es posible **(13)**. Una de las razones de más peso, es la calidad del vehículo de este fármaco en aves: el agua de bebida **(14)**.

Al igual que la mayoría de los fármacos utilizados en aves, la enrofloxacin se dosifica en el agua de bebida **(15,16)**. La importancia de su calidad ha sido ponderada por los investigadores de farmacología **(11,15)** y a pesar de ello, en las explotaciones avícolas comerciales no se invierte en mejorarla. Las altas concentraciones de bacterias y minerales en el agua de bebida pueden tener un efecto negativo sobre los procesos fisiológicos en el ave y es factible que interfieran con el efecto de los fármacos que a menudo se le incorporan **(11)**. En el caso de implementar una terapia antimicrobiana con enrofloxacin y con cualquier otro antimicrobiano, es factible pensar que la presencia de microorganismos provoque un desgaste de su potencia antes de que ocurra la absorción en el ave **(17)**. Se han realizado estudios en los que se menciona que las fluoroquinolonas, reducen su eficacia en presencia de iones metálicos como el Ca^{2+} **(18)** presentes en diferentes proporciones en el agua denominada como dura **(19)**, la cual es muy probable que se utilice en la industria avícola en muchas partes de México y del mundo, por lo que es factible pensar que no se está logrando el efecto máximo de la enrofloxacin.

1.2. Características fisicoquímicas de la enrofloxacin

El nombre químico de la enrofloxacin es 1-ciclopropil-6-fluoro- 4- oxo- 7 - (4-etil- 1 - piperazinil) - 1,4- dihidroquinolina- 3 - ácido carboxílico. Físicamente es un polvo cristalino blanquecino, poco soluble en agua (20). Permanece estable por años a una temperatura menor a los 30°C y se recomienda protegerla de los rayos ultravioleta debido a que es fotosensible*. La enrofloxacin puede existir en 4 formas posibles (protonado, zwitterion,* ión básico y en forma neutra no ionizada) dependiendo del pH en el cual se encuentre (18). Solo se le comercializa y utiliza en medicina veterinaria (21). La introducción de flúor como componente esencial de la molécula y la presencia del grupo etil-piperazinilo en la posición 7 permiten una penetrabilidad tisular y celular realmente sobresalientes que muy pocas sustancias antimicrobianas pueden alcanzar (20). Eso da lugar a ciertas particularidades farmacocinéticas, especialmente vinculadas a su distribución (17). Sus características químicas permiten que interactúe con diferentes moléculas produciendo efectos diversos, ya sea cuando se le combina con otros preparados farmacéuticos (17) o con elementos presentes en el medio donde se deposita (18) (agua ó alimento). Se menciona que *in vivo* tiene un efecto sinérgico con aminoglicósidos, cefalosporinas de tercera generación y penicilinas de amplio espectro calificado como impredecible; sin embargo *in vitro*, es incompatible químicamente con estos fármacos*. No resulta difícil encontrar que el veterinario combine enrofloxacin con otras sustancias directamente en el depósito de agua, práctica que seguramente resultará en la neutralización parcial o total de la enrofloxacin o de ambos fármacos (4). En campo llega a combinarse con tilosina[†]; pero en las bases de datos consultadas (MEDLINE, VETCD, AGRÍCOLA, BEASTCE, etc) no se encontraron documentos que respaldaran teóricamente, la eficacia de tal práctica. A comparación de otros antimicrobianos, se considera segura para aves y se menciona que pollitos de 1 día toleran dosis de hasta 625 mg/kg/21 días administrada en el agua de bebida. Sólo es probable la disminución del peso y del consumo de agua en comparación con aquellos que recibieron dosis normales*.

* <http://www.fda.gov/cvm>

† zwitterion: molécula que posee tanto cargas positivas como negativas.

<http://www.jpharther.jour.tcu.edu/20030000.html>

Referencia personal. Dr. Jaime Cortez. Avícola Texcoco. 2002.

1.3. Farmacodinamia

Su efecto bactericida es dependiente de la concentración (16) y en comparación con otros antimicrobianos aún del mismo grupo, se necesitan concentraciones más bajas para que logre su efecto * (10). Inhibe enzimas claves para la reparación y replicación del material genético bacteriano (16, 20), de las cuales las más importantes son la topoisomerasa II (también conocida como DNA girasa) y la topoisomerasa IV (20). Se sabe que estas enzimas desdoblan el material genético bacteriano (DNA), el cual se encuentra en forma de madeja y literalmente lo desenredan convirtiéndolo en una forma lineal, que permite un adecuado arreglo espacial del ADN dentro de la célula bacteriana para lograr su copia y replicación (20). Además, interfiere con la respiración bacteriana y altera la integridad de sus membranas (22). El ácido carboxílico en la posición 3 y el grupo cetona en la posición 4 son necesarios para la inhibición de dichas enzimas; los grupos químicos presentes en la posición 1 y 7 se relacionan con la cinética y espectro (16).

1.4. Espectro antimicrobiano de la enrofloxacin

La enrofloxacin es una fluoroquinolona bactericida con excelente actividad contra bacterias Gram⁻ y buena contra bacterias Gram⁺ y *Mycoplasma sp* * (11). No tiene afinidad por las células del hospedador. Resulta útil en el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias intracelulares (16). En avicultura se utiliza principalmente para el tratamiento de colibacilosis y micoplasmosis*. Actualmente la dosis recomendada es de 10 mg/kg cuando el producto comercial se encuentra al 10%, con lo que se logra una concentración final de 0.1% en el agua de bebida (10), pero en campo se han usado empíricamente hasta 25 mg/kg, lo que nuevamente sugiere una reducción de su eficacia clínica (9) lo que pudiera sugerir el uso de preparados de enrofloxacin de dudosa calidad (10) o disminución de la actividad antimicrobiana en presencia de minerales (18).

* <http://www.fda.gov/cvm>

1.5. Farmacocinética de la enrofloxacin en aves administrada por vía oral

En cuanto al comportamiento farmacocinética de la enrofloxacin en aves cuando se administra vía oral en el agua de bebida, se menciona que se distribuye rápida y ampliamente hacia la mayoría de tejidos. Su velocidad de absorción es más rápida cuando se administra por vía subcutánea ($T_{1/2}$ abs= 0.36 h) o intramuscular ($T_{1/2}$ abs= 0.37 h) que cuando se administra por vía oral ($T_{1/2}$ abs= 0.92 h) (23). Se calculan los porcentajes de biodisponibilidad en 59.58% (24) para la vía oral, 80.78% para la subcutánea y 87.51% para la intramuscular (23). Sin embargo, existen distintos datos en la literatura y varían de acuerdo al autor (véase cuadro 1).

1.6. Biodisponibilidad

Dado que la enrofloxacin es un antibacteriano concentración dependiente (16) es fundamental definir su biodisponibilidad y con ello asegurar respuestas clínicas repetibles e ideales. Según la FDA (*Food and Drug Administration*), biodisponibilidad puede definirse como “la velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, se hace disponible en la circulación sistémica e idealmente en su lugar de acción”. Resulta evidente que el acceso del fármaco a la circulación sistémica es un proceso que puede cuantificarse fácilmente, dado que es posible tomar muestras de sangre y determinar la concentración del fármaco en ella (25); no así las respuestas clínicas dado que en ellas se presentan muchas variables de difícil control.

A fin de detectar y cuantificar a la enrofloxacin puede utilizarse la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (26), pero si además se necesita evaluar el efecto microbiológico, se requiere la utilización de técnicas microbiológicas cuantitativas de actividad antimicrobiana como la descrita por Bennet *et al* (27). De acuerdo con Quintin M.(1999), existe un efecto potenciado entre la enrofloxacin y la ciprofloxacina (metabolito) y este efecto se manifiesta como concentración real de actividad antimicrobiana y por ello es un método que da una perspectiva más clara clínicamente de los valores derivados de estudios farmacocinéticas (28).

Existen numerosos factores a tomar en cuenta cuando se realiza un tratamiento por vía oral en aves, ya que en conjunto o por separado afectan la absorción y biodisponibilidad de los fármacos; entre se pueda mencionar a los relacionados con el principio activo, como son el tipo de sal y pureza de la misma, solubilidad, estabilidad y las posibles interacciones con elementos presentes en el medio en el que se le deposita (25), ya sea por una elevada concentración de minerales, bacterias o materia orgánica (11); también se encuentran los relacionados con el individuo, como son: tipo de ave, edad, estado de salud y fisiológico, por mencionar algunos (15).

1.7. Vías de administración en aves

Las aves pueden medicarse individualmente o por parvada; para el primer caso puede utilizarse cualquier vía conocida (intramuscular, intravenosa, oral, tópica, etc), pero en aves comerciales es evidente que se prefiere la vía oral. Cuando se proporciona un tratamiento se espera un efecto rápido (15).

Se sabe que el comportamiento farmacocinético de cualquier fármaco varía dependiendo de la vía de administración; un claro ejemplo es la reducción del 87% de la biodisponibilidad de la enrofloxacin cuando se administra por vía intramuscular, a un 59.58% cuando se administra oralmente (24). Esta reducción de biodisponibilidad se acentúa aún más con la administración en el alimento (11). Se considera inadecuado proporcionar enrofloxacin en el alimento ya que no se logran los picos deseados en la C_{max} (16) debido a que se sabe que se producen interacciones de la enrofloxacin, principalmente con minerales y porque la forma en que se consume el alimento no generará un efecto de "dosis bolo" (13). A la fecha no se ha logrado la formulación de preparados que protejan al principio activo para que no se vean afectadas las propiedades farmacológicas requeridas de elevadas C_{max} y rápido t_{max} (14). Por lo tanto cuando se administra enrofloxacin por vía oral, es aconsejable que se aplique vía agua de bebida y de forma tal que se asemeje lo más posible a una aplicación tipo bolo, lo cual puede lograrse restringiendo el agua antes de la medicación, asegurando agua fresca y limpia, bebederos a una altura adecuada, etc. (13). Obviamente por ésta vía y en comparación con el alimento, hay menos elementos con los que se pudiera

interferir, sin embargo, esto aplica cuando la calidad del agua es muy buena, como la utilizada en pruebas de laboratorio, de lo contrario podemos encontrar elementos que desgasten el efecto farmacológico (11). Se considera que medicar en el agua de bebida es una práctica económica (4, 11, 13,15, 29, 30, 31 ,32). Sin embargo, si se toman en cuenta las fallas en los tratamientos y por ende las repeticiones de los mismos, la ventaja económica puede ser solo aparente.

1.8. Calidad del agua de bebida

Para que un tratamiento en el agua sea eficaz, se requiere que su calidad sea al menos aceptable y que los contaminantes se encuentren dentro de los rangos establecidos para las aves (31, 32, 33). La calidad del agua está determinada por varios criterios y resulta difícil definir que es lo que constituye el agua de bebida de buena calidad para las aves, ya que muchos de los *estándares* han sido derivados de los desarrollados para otras especies, especialmente de los humanos (32). En la práctica se considera que es suficiente con que el agua sea clara, fresca, no tenga olor y no presente material contaminante visible (31). No obstante, se deben cuantificar los microelementos que pueden convertirse en nocivos, si se encuentran en grandes cantidades (32) amen de que pueden afectar la eficacia de un tratamiento. Los datos obtenidos en cuanto a las concentraciones permisibles de algunos elementos y de microorganismos presentes en el agua de bebida para aves, difieren en un rango muy amplio (15, 32, 33). En el cuadro 2 se resumen algunas de estas características.

Un factor importante que debe considerarse, es que el consumo del agua varía en función del tipo y edad del ave, temperatura ambiental, fotoperiodo y procesos patológicos (30). Tomando en cuenta estos aspectos, es de esperarse que la dosis administrada generalmente no corresponde a la calculada (11). Debe señalarse que las recomendaciones que emiten los laboratorios respecto al uso de la enrofloxacin en el agua de bebida, no incluían observaciones sobre la calidad que debe tener la misma; sin embargo, dada la importancia de los resultados obtenidos en tratamientos con agua de dureza elevada, se han visto en la necesidad de implementar dentro de sus pruebas de control de calidad, la estabilidad y eficacia de sus productos diluidos en agua dura.

A la presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y sus sales (carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos y ocasionalmente nitratos) en el agua, se le llama dureza (34,35,36). Estos metales se incorporan cuando el agua se filtra por las diferentes capas terrestres. El Al^{3+} y Fe^{3+} son considerados como iones causantes de dureza, pero en menor grado ***. De acuerdo con el tipo de sal presente se le conoce como dureza carbonatada o dureza no carbonatada; véase cuadro 3 (34) y la clasificación más aceptable del agua dura por la cantidad de sales se presenta en la cuadro 4 (34, 36).

Cuando se requiera de un estándar de referencia sobre la calidad del agua para aves, la información debe tomarse con precaución ya que no se sabe en que se basan algunos documentos para establecer sus límites máximos, pudiendo ser muy altos; por ejemplo, se encontró que niveles de dureza de 1500 ppm son aceptables (32), esto se refiere sólo al hecho de que no produce efectos en la salud del ave, pero no se evalúa el efecto de los minerales implicados en los tratamientos que pudieran administrarse por este medio. Es importante el control de la dureza del agua ya sea por la posible reducción de eficacia de los productos que en ella se depositan o porque la precipitación de las diferentes sales puede dañar el sistema de distribución del agua, siendo la principal causa de obstrucción de los bebederos (31), con lo que la dureza puede llegar a convertirse en un verdadero problema económico para la explotación*.

En el presente estudio se le dio especial importancia a la dureza producida por el Ca^{2+} debido a que se tiene como antecedente que este mineral interactúa con las fluoroquinolonas produciendo efectos que pudieran parecer contradictorios; en humanos limita la biodisponibilidad de estos antimicrobianos (22), pero por otro lado, facilita el ingreso a la bacteria y aumenta el efecto antibacteriano (8, 37). Así, resulta congruente plantear la hipótesis de que la biodisponibilidad de la enrofloxacin puede alterarse si se administra en agua dura; los cambios en la concentración/actividad antimicrobiana en el plasma pueden cuantificarse fácilmente mediante métodos microbiológicos (28).

*** <http://www.fing.uach.mx/sanitaria/practicaV.html>

* <http://www.portalveterinaria.com/secciones.php?op=viewarticle&artid=172>

A pesar de los estudios realizados hasta la fecha no resulta claro que por un lado se obtenga una mejor actividad antimicrobiana *in vitro* con la ayuda de minerales y por el otro se observe una reducción de la absorción de enrofloxacin (18).

Es congruente asumir que es necesario estudiar el impacto clínico – farmacológico que el agua dura y sus iones tienen sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de la enrofloxacin así como sobre su biodisponibilidad y eficacia.

II. Justificación

Una vez logrado un diagnóstico preciso de que existe una infección bacteriana, una terapia eficiente depende del buen manejo del o los antibacterianos (11). En particular para los antimicrobianos concentración-dependientes como la enrofloxacin es imprescindible lograr concentraciones pico (C_{max}) lo más elevadas posible (13,16). Para ello se requiere de un manejo cuidadoso del acto de dosificar la enrofloxacin, que incluye su aplicación a tiempo, buen manejo el agua de bebida y tener certeza de que se usa la dosis suficiente durante el tiempo necesario hasta alcanzar la recuperación (11, 13). Generalmente se cree que se cumplen con los puntos mencionados, pero no se toman en cuenta las posibles interacciones. El panorama resulta confuso si se observa que por un lado se menciona una disminución de la biodisponibilidad de las fluoroquinolonas en presencia de iones divalentes (17), mientras que por otro lado se postula que la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} es esencial para penetrar a la bacteria (8). Por lo tanto, se consideró de importancia para la avicultura definir la influencia de los minerales en la actividad antimicrobiana y biodisponibilidad de la enrofloxacin.

III. Hipótesis

- La dureza del agua modifica la eficacia *in vitro* de la enrofloxacin frente a cultivos de bacterias que afectan a las aves.
- Puede evaluarse el efecto *in situ* de la enrofloxacin diluida en agua dura para simular la modificación de la absorción.
- Puede alterarse la biodisponibilidad en pollos de la enrofloxacin diluida en agua dura.
- La administración estratégica de Ca^{2+} a pollos modifica la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin.

IV. Objetivos

- Evaluar comparativamente la modificación de la eficacia *in vitro* de la enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y con una dureza determinada de 195 ppm frente a cultivos de bacterias clave en la avicultura.
- Evaluar *in situ* la cantidad de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y agua muy dura que es capaz de atravesar una barrera orgánica simulando el proceso de absorción.
- Medir la biodisponibilidad de la enrofloxacin cuando se administra a pollos en el agua de bebida con diferentes grados de dureza.
- Evaluar si la administración estratégica de Ca^{2+} a pollos modifica la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin.

V. Materiales y métodos

5.1. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de la enrofloxacin diluida en agua muy dura

5.1.1. Preparación de agua dura sintética por el método M/29 descrito por la Organización Mundial de la Salud -WHO/M/29 .

Se necesitan cloruro de calcio anhidro grado reactivo (CaCl_2), cloruro de magnesio hexahidratado grado reactivo $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y agua desmineralizada. Se disuelven 304 mg de CaCl_2 y 139 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua desmineralizada. Con esta fórmula se obtiene agua con una dureza de 371 mg/L (ppm) calculada como ppm de carbonato de calcio CaCO_3^{d} .

5.1.2. Cálculo matemático de dureza

De acuerdo al método M/29 se obtiene agua con una dureza de 371 mg/L; no se describe como se calculó tal cantidad pero puede inferirse que se determinó de la siguiente forma para el Ca^{2+}

- calcular el peso molecular del CaCl_2
- determinar la concentración de Ca^{2+} en éste de acuerdo a la cantidad agregada
- calcular el peso del CaCO_3
- utilizando la cantidad de Ca^{2+} dada por el CaCl_2 determinar la cantidad de Ca^{2+} equivalente en CaCO_3 .

Para el Mg^{2+}

- determinar el peso molecular del $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- determinar la concentración de Mg^{2+} en el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acuerdo a la cantidad agregada y se aplica la siguiente formula que proporciona la cantidad de dureza dada por cualquier mineral diferente al Ca^{2+} pero expresado en ppm como CaCO_3 .

(36):

http://www.WHO.int/ctd/docs/whopes/new_docs/methods.specs/MethodM29.pdf

$$\text{ppm como CaCO}_3 = X \text{ mg/L} \cdot \frac{50}{\text{peso del Mg}^{2+} / 2}$$

5.1.3. Métodos para la cuantificación de la dureza

El método colorimétrico de titulación de la dureza del agua con EDTA es uno de los más utilizados por la facilidad de llevarlo a cabo en campo ya que no requiere de aparatos. Se menciona que es una técnica confiable basada en el cambio de la coloración de las muestras a evaluar, dado por la reacción de los minerales con el EDTA y un indicador^{*}; sin embargo, se decidió llevar a cabo el cálculo de dureza determinando la concentración de Ca^{2+} por absorción atómica debido a que con la titulación con EDTA los resultados pueden variar dependiendo de la apreciación de la persona que realice el experimento^{**}.

5.1.4. Cuantificación de Ca^{2+} y Mg^{2+} por absorción atómica

La absorción atómica es una técnica analítica instrumental capaz de analizar cualitativa y cuantitativamente hasta 67 elementos de la tabla periódica detectando hasta ppm. (38).

El CaCO_3 es el compuesto más abundante en el agua dura (34, 35, 36), pero no puede cuantificarse como tal por esta técnica ya que solamente se detecta y cuantifica el Ca^{2+} ; una vez que se obtienen las lecturas de este mineral, la concentración en forma de carbonato se determina matemáticamente (36). Este procedimiento se llevó a cabo para confirmar que la cantidad de Ca^{2+} esperada, coincidía con la detectada y en caso de ser necesario ajustar la cantidad de sales para lograr una dureza adecuada.

* <http://members.trip.com/dureza.htm>

** <http://www.net-minerales.org/BV11.D/calco.htm>

5.1.5. Preparación de las muestras de agua muy dura para su análisis por absorción atómica

Se preparó agua muy dura de acuerdo al método M/29 descrito por la Organización Mundial de la Salud -WHO/M/29^{0 0}, con la cual teóricamente se obtendría una dureza de 371 mg/L como CaCO₃. Se tomó una alícuota de 10 mL, se añadieron aproximadamente 500 µL de HCl para eliminar cualquier partícula de materia orgánica y se procedió a realizar la lectura. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica ajustado a una longitud de onda de 422.7 nm, flama de aire/acetileno, con lámpara de cátodo hueco y abertura espectral señaladas en el manual de operación del fabricante (39).

5.1.6. Dilución de la enrofloxacin en agua muy dura preparada en laboratorio y agua desmineralizada

Para poder establecer la reducción de la eficacia de la enrofloxacin debida a la presencia de minerales en el agua debe hacerse un estándar con agua desmineralizada. Se utilizaron 100 mL de cada tipo de agua (desmineralizada y muy dura) y se añadieron 100 µL de enrofloxacin al 10% para lograr una concentración final al 0.1% de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\text{Dosis recomendada} = 10 \text{ mg/kg} = 10 \text{ mg} - 1 \text{ L}$$

$$X - 0.1 \text{ L}$$

$$X = 10 \text{ mg}$$

$$\text{Concentración de enrofloxacin} = 100 \text{ mg} - 1 \text{ mL}$$

$$10 \text{ mg} - X$$

$$X = 0.1 \text{ mL} = 100 \text{ µL}$$

http://www.WHO.int/ctd/docs/whopes/new_docs/methods.specs/MethodM29.pdf

5.1.7. Preparación del medio de cultivo

El agar utilizado para el cultivo bacteriano fué el Müller Hilton. Para prepararlo se pesaron 38 gramos del mismo en una balanza analítica y se depositaron en un matraz. Se le añadió 1 litro de agua destilada, se agitó hasta que se observó una solución uniforme y se dejó reposar de 10-15 min. Se colocó sobre una plancha, la cual al mismo tiempo que calentó, agitó el contenido del matraz. Se dejó hervir y se retiró de la plancha. Se esterilizó en autoclave. El agar se dejó enfriar cuidando que no se gelatinizara y se vació en un refractario estéril tipo Pirex® de 21 X 20 cm; se cuidó que no se formaran burbujas en la superficie ya que pudieron interferir con la lectura de los halos de inhibición.

5.1.8. Preparación del estándar bacteriano y siembra de bacteria

Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Escherichia coli*. Para facilitar la siembra bacteriana, se utilizó una solución de ésta, la cual contiene una cantidad conocida de bacterias y que se prepara de la siguiente forma: en un tubo con tapón de rosca se colocaron 5 mL de agua destilada y una asada de cultivo bacteriano joven de *Escherichia coli*; se agitó con un Vortex hasta que se observó sin grumos. Por medio de los estándares de Mc Farland se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una turbidez del 0.5 de ésta escala; esto se hizo comparando en un fondo negro la solución bacteriana preparada con el estándar. Otro método para hacer la solución bacteriana es depositar 10 mL de agua destilada en un tubo; aplicar una asada de bacteria y agitar con un Vortex durante 30 segundos; introducir al espectofotómetro esperando que la transmitancia sea del 60-65%, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^{14} .

Una vez que el agar estuvo frío y solidificado se depositaron 150 μ L de la suspensión bacteriana con una micropipeta y con la ayuda de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar, dividiéndolo en mitades y realizando movimientos partiendo del centro a la periferia. Una vez terminado este procedimiento se hicieron pequeños pozos con un sacabocados en los cuales se

depositará 100 µL de las muestras a evaluar. La placa se incubó a 37°C/24 horas esperando obtener un crecimiento uniforme de bacterias. Si se producen halos de inhibición, éstos se miden utilizando un Bernier digital para obtener mayor precisión.

5.2 Evaluación *in situ* del efecto antimicrobiano de la enrofloxacin diluida en agua muy dura

5.2.1. Preparación del intestino

Se utilizaron 20 pollos de 20 días de edad y se hicieron 2 grupos de 10 individuos. Los pollos se sacrificaron en diferentes días debido a que fue un proceso laborioso y a que se necesitaron sacrificar uno a uno. Inmediatamente después de sacrificados se obtuvo un fragmento intestinal de duodeno, al cual se le hizo una atadura en el extremo distal; en el extremo proximal se fijó una sonda flexible de 3 mm de diámetro, la cual sirvió para administrar la solución de enrofloxacin en el lumen intestinal; se administraron 100 µL de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y 100 µL de enrofloxacin en agua muy dura. El fragmento intestinal se fijó a la cámara con la ayuda de 2 ganchos y se mantuvo viable con solución Tyrode[♦] previamente calentada hasta 32°C y oxigenada con una bomba. Esta cámara permitió un adecuado intercambio de solución, evitando la acumulación de desechos tisulares (**Fig 1**).

Los grupos evaluados fueron: intestino en el que se aplicó la enrofloxacin diluida en agua desmineralizada e intestino en el que se aplicó la enrofloxacin diluida en agua muy dura.

♦ Solución salina utilizada para experimentos de fisiología, cultivos tisulares y preservación de tejidos; sus ingredientes son: NaCl; KCl; CaCl₂·6H₂O; MgCl₂·6H₂O; NaHCO₃; NaH₂PO₄; Glucosa y agua desmineralizada.

http://www.whonamedit.com/synd.cfm_2120.html

Se tomó el tiempo de inicio y se realizaron muestreos a los 15, 30 y 45 min., 1, 1.5, 2, 2.5, y 3 h., tanto de la solución que se encuentra en el lumen intestinal como de la que se encuentra en la cámara de órganos aislados, obteniéndose 40 µl; con este procedimiento se obtuvieron muestras en las que fue posible cuantificar la enrofloxacin presente a un lado y al otro de la pared intestinal; cada una de las muestras se evaluaron por el método microbiológico de Bennet (27).

5.3. Evaluación *in vivo* del efecto antibiótico de la enrofloxacin diluida en agua dura

La preparación del agua con diferentes grados de dureza, del medio de cultivo, del estándar bacteriano, siembra de la bacteria y la solución final de enrofloxacin se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito para la evaluación *in vitro*.

5.3.1. Dosificación de las aves, obtención y procesamiento de muestras

La fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones el CEIEPA de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron 250 pollos Arbor Acres de 3 semanas de edad con un peso promedio de 850 ± 12 gramos, clínicamente sanos y los cuales no recibieron medicación antimicrobiana al menos 2 semanas antes de comenzar el estudio. Un día antes se pesaron individualmente y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 50 aves cada uno. Los grupos correspondieron a los grados de dureza quedando de la siguiente forma: grupo I en el cual se administro agua muy dura; grupo II con agua dura, grupo III con agua moderadamente dura, grupo IV con agua poco dura y grupo V con agua blanda o suave.

Con el fin de favorecer el consumo de agua, se dietaron a las aves 6 horas antes de comenzar el estudio y el agua se retiró 3 horas antes. Se realizaron diluciones de enrofloxacin en el agua con diferentes grados de dureza utilizando un producto al 10%. La dosis es de 10 mg/kg logrando una concentración final al 0.1% y se les proporcionó individualmente a las aves utilizando una sonda semi rígida unida a una

jeringa de 10 mililitros graduada que ayudó a administrar la dosis exacta a cada ave. Dicha sonda llegó hasta proventrículo donde finalmente se depositó la solución medicada. Se separaron a las aves que regurgitaron la solución. Los pollos se puncionaron en las venas del ala o yugular y el volumen obtenido fue de al menos 3 mL de sangre/ave. Los tiempos de sangrado fueron a las 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4.5, 6, 8, 12 y 24 horas realizando 3 sangrados por grupo y por tiempo, con un intervalo máximo entre las tomas de muestras de 2 min. Tres horas después las aves tuvieron acceso al alimento y al agua.

Una vez obtenidas las muestras de sangre se depositaron en tubos vacutainer estériles con rosca previamente identificados para evitar errores. Se centrifugaron durante 20 min hasta que se separaron el paquete celular del suero. Éste último se colocó en tubos "Eppendorf" estériles de 1 mL previamente identificados; la cantidad promedio de suero que se obtuvo fue de 0.6 mL. Se mantuvieron en refrigeración hasta que fueron utilizados.

Este tipo de muestreo permite realizar mediciones y llevar un seguimiento de los principales parámetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} , AUC) que se evalúan en un estudio de este tipo (25). La relación actividad/concentración de la enrofloxacin y metabolitos vs. tiempo se analizó con el software PKAnalyst*, con el modelo 5 ($r < 0.95$). La fórmula general es (40):

$$\text{Concentración (tiempo)} = \frac{\text{Dosis} * K_{AE} * \text{tiempo}}{\text{Volumen}} e^{-K_{AE} * \text{tiempo}}$$

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

Dicho programa reporta área bajo la curva (AUC), constante híbrida para la fase terminal de eliminación (β), vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$), tiempo promedio de residencia (MRT), concentración sérica máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}), vida media de absorción ($T_{1/2abs}$), y momento bajo el área curva (AUMC). La AUC se confirmó utilizando el método trapezoidal a través de Microsoft-EXCELL.

* MicroMath, Scientific Software, SALT Lake City, UTA, USA, 1995.

VI Resultados

6.1. Evaluación *in vitro*

6.1.1. Lecturas de absorción atómica para comprobar la cantidad de Ca^{2+} en el agua dura.

Conforme a la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud -WHO/M/29^o se preparó la muestra de agua muy dura (371 mg/L). En el cuadros 5 se presentan las lecturas correspondientes.

De acuerdo a lo obtenido por absorción atómica, las muestras preparadas por el método WHO/M/29^o, tienen un 86.30 % de exactitud a lo esperado para el calcio.

109.7 mg (esperado) – 100%

94.68 mg (obtenido) - X

X= 86.30 %

6.1.2. Determinación de Mg^{2+} en agua dura preparada.

Conforme a la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud -WHO/M/29^o se preparó la muestra de agua muy dura (371 mg/L). En el cuadro 6 se presentan las lecturas correspondientes para comprobar que la cantidad de Mg^{2+} agregada correspondía a la esperada.

De acuerdo a lo obtenido por absorción atómica, las muestras preparadas por el método WHO/M/29^o, tienen un 94.64 % de exactitud a lo esperado para el magnesio.

16.62 mg (esperado) – 100%

15.73 mg (obtenido) - X

X= 94.64 %

6.1.3. Cálculos para ajustar la cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} para obtener agua muy dura (195 ppm).

Los resultados obtenidos por absorción atómica se utilizaron para ajustar la dureza a 195 mg/L; se calculó de la siguiente forma:

a) se calculó el peso molecular del CaCl_2

$$\text{Ca} \quad 40.08 \times 1 = 40.08$$

$$\text{Cl} \quad 35.45 \times 2 = \underline{70.90}$$

$$110.98 \text{ g/mol}$$

b) se determinó la concentración de Ca^{2+} en éste de acuerdo a la cantidad agregada

$$110.98 \text{ g de } \text{CaCl}_2 - 40.08 \text{ g de } \text{Ca}^{2+}$$

$$0.304 \text{ g de } \text{CaCl}_2 - \quad X$$

$$X = 0.1097 \text{ g de } \text{Ca}^{2+} = 109.7 \text{ g/mol } \textit{\underline{(esperado)}}$$

c) se calculó el peso molecular del CaCO_3

$$\text{Ca} \quad 40.08 \times 1 = 40.08$$

$$\text{C} \quad 12 \times 1 = 12$$

$$\text{O} \quad 16 \times 3 = \underline{48}$$

$$100.08 \text{ g/mol}$$

d) utilizando la cantidad de Ca^{2+} dada por el CaCl_2 se determinó la cantidad de Ca^{2+} equivalente en CaCO_3 .

$$100.08 \text{ g de } \text{CaCO}_3 - 40.08 \text{ g de } \text{Ca}^{2+}$$

$$X \quad - \quad 109.7 \text{ mg}$$

$$X = 273 \text{ mg de } \text{Ca}^{2+} \text{ como } \text{CaCO}_3$$

Para el Mg^{2+}

a) se determinó el peso molecular del $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$$\text{Mg} \quad 24.31 \times 1 = 24.31$$

$$\text{Cl} \quad 35.45 \times 2 = 70.90$$

$$\text{H} \quad 1 \times 12 = 12$$

$$\text{O} \quad 16 \times 6 = \underline{96}$$

$$203.2 \text{ g/mol}$$

b) se determinó la concentración de Mg^{2+} en el $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ de acuerdo a la cantidad agregada

$$203.2 \text{ g de } MgCl_2 \cdot 6H_2O - 24.31 \text{ de } Mg^{2+}$$

$$\text{Si se ponen } 0.139 \text{ g de } MgCl_2 \cdot 6H_2O - X$$

$$X = 16.62 \text{ mg de } Mg^{++} \text{ (esperado)}$$

Para el análisis típico de agua la conversión a $CaCO_3$ de cualquier ión diferente al Ca^{2+} puede efectuarse con la fórmula postulada por Romero R.J.A (36).

$$\frac{24.32 \text{ g } (Mg^{2+})}{12.16} \cdot \frac{50}{100} = 98.5 \text{ mg/L como } CaCO_3.$$

Al sumar $98.5 + 273 = 371.5 \text{ mg/L}$ de dureza como $CaCO_3$ coincidió con lo reportado por la WHO ³³.

Partiendo de las 371 ppm de dureza se tiene que:

$$371 \text{ ppm} - 100 \% \text{ de dureza}$$

$$273.94 \text{ ppm} - X \% \quad (273.94 \text{ ppm es la dureza correspondiente al } Ca^{2+})$$

$$X = \text{el } 80.02 \% \text{ de la dureza está dada por el } CaCl_2$$

$$371.3 \text{ ppm} - 100 \% \text{ de dureza}$$

$$68.36 \text{ ppm} - X \% \quad (68.36 \text{ ppm es la dureza por el } Mg^{2+})$$

$$X = \text{el } 19.98 \% \text{ de la dureza está dada por el } MgCl_2 \cdot 6H_2O$$

Para obtener agua con una dureza de 195 ppm

$$195 \text{ ppm} - 100 \% \text{ de dureza}$$

$$X - 80.02 \%$$

$$X = 156 \text{ ppm corresponden al } CaCl_2$$

$CaCl_2$	Ca^{2+}
0.304 g	94.68 mg (obtenido por absorción atómica)

X 156 mg

X= 500.88 g/mol de CaCl_2

Magnesio

195 – 100 % de dureza

X - 19.98 %

X= 39 ppm corresponden al $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Mg^{2+}

0.139 g

15.73 mg (obtenido por absorción atómica)

X

39 mg

X= 344.62 g/mol de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Por lo tanto se utilizaron 500.88 mg de CaCl_2 y 344.62 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua desmineralizada y no 304 mg de CaCl_2 y 139 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como originalmente se menciona en materiales y métodos.

6.1.4. Evaluación de la actividad *in vitro* de la enrofloxacin en aguas muy duras (195 ppm de CaCO_3) y en agua desmineralizada frente a cultivos de *E. coli*.

Conforme a la metodología ya descrita y basada en los principios de Bennet *et al* (1966), se realizaron 20 ensayos (10 para cada tipo de agua) de la actividad antimicrobiana *in vitro* en difusión en agar, diluyendo la enrofloxacin en agua muy dura o en agua desmineralizada. Los resultados se presentan en el cuadro 7 y en la figura 2 puede observarse la relación lograda para ambas corridas.

6.1.5 Conclusión estadística del ensayo *in vitro*

La comparación de los resultados mediante un análisis de varianza indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas logradas con los halos obtenidos con enrofloxacin diluida en agua muy dura y los logrados con agua desmineralizada ($P < 0.05$).

El análisis por las pruebas de Dunnet y Bonferroni indican que existen diferencias entre ambas curvas con una $P < 0.05$.

Las regresiones lineales de cada una de las curvas muestran que solo el resultado de enrofloxacin en agua desmineralizada brinda una regresión lineal de 0.99, mientras que con la enrofloxacin en agua muy dura es de 0.94, lo cual indica una mayor variación en los datos.

Resultados de la regresión lineal

a) Enrofloxacin diluida en agua desmineralizada

R	DE	N	P
0.99	0.68	10	<0.0001

b) Enrofloxacin diluida en agua con una dureza de 195 ppm.

R	DE	N	P
0.95	0.65	10	<0.0005

6.2. Evaluación *in situ*; determinación de la absorción de la enrofloxacin en intestino aislado de pollo

Dado que existe una combinación de iones presentes en la solución Tyrode (NaCl; KCl; CaCl₂·6H₂O; MgCl₂·6H₂O; NaHCO₃; NaH₂PO₄), fue necesario evaluar si estos interferían con la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin. En el cuadro 8 y la figura 3 se presentan los datos comparativos de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la enrofloxacin diluida en Tyrode, en agua desmineralizada y en agua muy dura elaborada. Se puede apreciar una disminuci3n de la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin diluida en soluci3n Tyrode.

El an3lisis de varianza indica que las diferencias entre las curvas son estadisticamente significativas ($P < 0.05$). Las pruebas de Dunnet y Bonferroni, muestran que existe una diferencia estadisticamente significativa entre la curva obtenida con enrofloxacin diluida en agua muy dura (195 ppm) y enrofloxacin diluida en soluci3n Tyrode; mientras que no existen diferencias estadisticamente significativas entre la curva obtenida con enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y agua muy dura 3 con la soluci3n Tyrode.

Se realiz3 una curva de recuperaci3n de enrofloxacin en soluci3n Tyrode (Fig. 4), a fin de poder estimar la verdadera concentraci3n de enrofloxacin en este medio en los estudios de intestino aislado.

Se evalu3 la inhibici3n de crecimiento de *Escherichia coli* utilizando muestras de 40 μ L de contenido intestinal y de la c3mara de 3rganos, lo cual corresponde a la fracci3n no absorbida y absorbida (respectivamente).

En el cuadro 9 se presentan los datos de la enrofloxacin diluida en agua desmineralizada tanto del interior del intestino (duodeno) aislado de pollo como del exterior.

En el cuadro 10 se presentan los datos de la enrofloxacin diluida en agua muy dura tanto del interior del intestino (duodeno) aislado de pollo como del exterior.

En la figura 5 se grafican esta informaci3n.

El análisis estadístico que compara las absorciones de la enrofloxacin en agua muy dura y desmineralizada, mediante las pruebas de Bonferroni t-test y Dunnet, revelan que existe una disminuci3n apreciable y estadisticamente significativa ($P < 0.05$) de la absorci3n de la enrofloxacin cuando se le diluye en agua muy dura, en comparaci3n a lo observado con agua desmineralizada

6.3. Evaluación de la absorción de la enrofloxacin diluida en agua muy dura

6.3.1. Ajuste de sales para obtener agua con diferentes grados de dureza.

Para la evaluación *in vivo* se trabajaron diferentes grados de dureza; las partes por millón con las que se evaluó la eficacia *in vivo* fueron: 16.5, 35, 120, 175 y 195. De acuerdo a los porcentajes que corresponden a cada sal, se calcularon las cantidades que deberán agregarse.

1) **16.5 ppm** – 100 % de dureza deseada

$$X - 80.02 \%$$

X= 13.2 ppm corresponden al CaCl_2

CaCl_2	Ca^{2+}
110.98 g	40.08 g

0.304 g	X
---------	---

$$X = 0.109 \text{ g}$$

$$X = 109 \text{ mg (Es lo que se espera)}$$

Lectura de absorción

94.68 mg de Ca^{2+} (promedio de 4 lecturas)

CaCl_2	Ca^{2+}
0.304 g	94.68 mg

X	13.2 mg (que provienen del (0.02%))
---	--------------------------------------

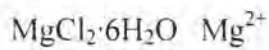
$$X = 42.38 \text{ mg de } \text{CaCl}_2$$

Magnesio

16.5 – 100 % de dureza

$$X - 19.98 \%$$

X= 3.3 ppm corresponden al $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



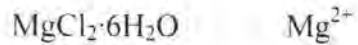
203.21 24.31

139 mg X

X = 16.62 mg es lo que se espera.

Lectura de absorción

15.73 mg de Mg^{2+} (promedio de 4 lecturas)



0.139 g 15.73 mg

X 3.3 mg

X = 29.16 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2) **35 ppm** – 100 % de dureza

X - 80.02 %

X = 28 ppm corresponden al CaCl_2



0.304 g 94.68 mg

X 28 mg

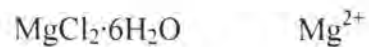
X = 89.90 mg de CaCl_2

Magnesio

35 – 100 % de dureza

X - 19.98 %

X = 7 ppm corresponden al $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



0.139 g 15.73 mg

X 7 mg

X = 61.85 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

3) **120 ppm** – 100 % de dureza

X - 80.02 %

X= 96.02 ppm corresponden al CaCl_2

CaCl_2	Ca^{2+}
0.304 g	94.68 mg

X	96.02 mg
---	----------

X= 308.30 mg de CaCl_2

Magnesio

120 – 100 % de dureza

X - 19.98 %

X= 23.98 ppm corresponden al $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Mg^{2+}
0.139 g	15.73 mg

X	23.98 mg
---	----------

X= 211.90 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

4) **175 ppm** – 100 % de dureza

X - 80.02 %

X= 140.03 ppm corresponden al CaCl_2

CaCl_2	Ca^{2+}
0.304 g	94.68 mg

X	140.03 mg
---	-----------

X= 449.61 mg de CaCl_2

Magnesio

175 – 100 % de dureza

X - 19.98 %

X= 34.97 ppm corresponden al $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

MgCl ₂ ·6H ₂ O	Mg ²⁺
0.139 g	15.73 mg
X	34.97 mg
X= 309.01 mg de MgCl ₂ ·6H ₂ O	

Los aportes de cada sal se resumen en el cuadro 11.

Los resultados obtenidos de la administración de enrofloxacin administrada en agua con diferentes grados de dureza se encuentran en el Anexo A que contiene el artículo titulado **“Influence Of Hard Water On The Bioavailability Of Enrofloxacin In Broilers”**. H. Sumano, L. Gutiérrez, R. Aguilera, R. Rosiles, M.J. Bernard, J. Gracia. Poultry Science. 83. 726-733. 2004 (45).

6.4. Resultados de la evaluación de la administración estratégica de Ca^{2+} y enrofloxacin en pollo de engorda. Véase anexo B que contiene el artículo titulado: "Enhacement of enrofloxacin serum antibacterial activity in calcium primed broilers". Aguilera, R., Gutiérrez, O. L., Sumano, L. H. (Próximo a ser publicado en el *Journal of Veterinary Research*) (46).

VII. Discusión

Una de las principales dificultades a vencer para obtener resultados poco variables en un ensayo biológico es la estandarización de métodos y sustancias que se han de incluir. En este estudio representó un factor clave la determinación de la dureza del agua, misma que no fue obtenida de campo sino preparada en el laboratorio. La principal razón para no utilizar agua obtenida en campo es la falta de homogeneidad de los componentes de esa agua, no sólo en lo que se refiere a las sales que pueda contener sino también a la carga bacteriana y la presencia de otros residuos que harían difícil la interpretación de resultados. De tal suerte, se utilizó la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud - WHO/M/29^{9 9} para elaborar agua de diferente dureza y se comprobó la concentración de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} por absorción atómica. Así pues, se pudo tener la certeza de manejar agua con una dureza conocida lo que permitió poca variación en los diferentes ensayos realizados.

Por otro lado, la técnica analítica elegida fue la de Bennet *et al* (27) basada en correlacionar la actividad antimicrobiana *in vitro* (mm de halo de inhibición en agar) con una concentración conocida de enrofloxacin. La confiabilidad del método para enrofloxacin resultó muy elevada ($R=0.99$), lo que concuerda con Küng, K.J *et al* (41) quienes validaron la técnica microbiológica y postularon que para fluoroquinolonas de tercera generación existía una elevada correlación entre lo logrado con el método microbiológico y lo obtenido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, la similitud entre lo obtenido por HPLC y el método microbiológico conlleva a un error del 10 ó 15% siendo el último método el que sobreestima la concentración de enrofloxacin. Esto ocurre debido a que existe suficiente evidencia como para sugerir que el metabolito de la enrofloxacin, la ciprofloxacina y la enrofloxacin tienen una actividad potenciada o sinérgica *in vitro* (41). Es posible, sin embargo, que esta diferencia sea poco apreciable en aves ya que se ha demostrado que la tasa de biotransformación de enrofloxacin a ciprofloxacina en esta especie es mucho menor que en otros animales domésticos (42, 43, 44).

http://www.WHO.int/ctd/docs/whopes/new_docs/methods.specs/MethodM29.pdf

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hasta antes de los estudios realizados en este trabajo se tenía la idea de que la presencia de aguas duras podía afectar la calidad de la respuesta clínica lograda con enrofloxacin. pero no se tenía una descripción clara del porqué podía suceder este fenómeno ni se había cuantificado la posible reducción de la eficacia (4, 11, 17). Los resultados *in vitro* obtenidos en la fase correspondiente de este estudio comprueban que la enrofloxacin tiene una mejor acción en presencia de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} que se encuentran en aguas dura. lo que aparentemente pudiera contradecir las sospechas de reducción de eficacia manifestada por otros autores (17, 18). Sin embargo, cuando se realizan los estudios con intestino aislado, se logran 2 importantes observaciones:

- 1) los iones presentes en la solución Tyrode disminuyen la cantidad de enrofloxacin que atraviesa la pared intestinal
- 2) dicha reducción es menor cuando, a pesar de que se tiene al intestino en solución Tyrode, se administra enrofloxacin en agua desmineralizada.

No obstante, estas evidencias, fue necesario realizar un ensayo *in vivo* para ver si el efecto se repetía en condiciones de irrigación íntegra y con el potencial de enrofloxacin inalterado. Se observó una reducción lineal en los valores de AUC y C_{max} , así como los cambios en el resto de las variables ($T_{1/2\beta}$, RT, MRT, β) lo que sugiere que existen interacciones entre la enrofloxacin y los minerales presentes en el agua dura por la formación de entidades químicas nuevas (complejos de coordinación con estequiometría 2:1). La formación de grupos químicos con Ca^{2+} ó Mg^{2+} disminuyen la absorción a través del epitelio GI; lo cual coincide con los resultados obtenidos en las pruebas con intestino aislado de pollo.

Puede resumirse que al menos en el presente estudio realizado con pollos, hubo una reducción de la biodisponibilidad cuando la enrofloxacin se administra en agua dura. En países desarrollados, la calidad del agua no es un factor limitante para la instalación de una granja avícola; la enrofloxacin no se usa en ellos.

En el caso de suplementos minerales en solución, se encontró Ca^{2+} en forma de gluconato y es el que se decidió utilizar debido a que en forma de carbonato es difícil solubilizarlo y que se requeriría de la adición de un poco de ácido que pudiera alterar los resultados. Uno

de los objetivos de éste estudio fué el de evaluar el efecto que se obtenía cuando se administraba la enrofloxacin con Ca^{2+} , pero a diferentes tiempos. Se demostró que si el gluconato de Ca^{2+} se dosifica 2 horas antes que la enrofloxacin, se obtiene una actividad antimicrobiana mejor que si se aplica sola, ó simultáneamente con el gluconato de Ca^{2+} . Se comprobó además que el Ca^{2+} inhibe la absorción de enrofloxacin a través del epitelio GI, pero, ésta mejora aproximadamente en 2 horas; es probable que altas concentraciones sanguíneas de Ca^{2+} mejoren la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin y su metabolito, ciprofloxacina. Ésta última conclusión coincide con lo publicado por Pletz, *et al* (47) quienes realizaron estudios con la gemifloxacina, quinolona de uso humano y CaCO_3 para evaluar como se modificaba la absorción y encontraron que existen diferencias significativas en la biodisponibilidad de éste antimicrobiano si se administra sola, simultáneamente con el CaCO_3 ó a diferentes tiempos. En humanos, al igual que en pollos se mejora la biodisponibilidad cuando se administra 2 horas antes el CaCO_3 que la gemifloxacina.

La eficacia de la enrofloxacin requiere C_{max} elevadas (10, 13 y 14) de acuerdo con Blas y Vaquero (48) existen ciertas normas en el uso de antimicrobianos que pueden prevenir el surgimiento de resistencias bacterianas y uno de los puntos en los que hacen énfasis es que “las concentraciones elevadas de antimicrobianos pueden ser capaces de suprimir la generación de resistencias y su evolución. Y en particular dosis elevadas durante la primera y segunda dosificaciones evitan la resistencias” (48). Esto es particularmente cierto para fluoroquinolonas (13,22), porque son las concentraciones medias (ni altas ni bajas) las que favorecen la selección de bacterias resistentes (48, 49, 50). En México es factible suponer que por la deficiente calidad de las enrofloxacinas (51) y su falta de bioequivalencias (5, 10, 52) se esté generando el medio apropiado para minimizar la eficacia del último antibacteriano diseñado para salud animal hace más de 2 décadas, la enrofloxacin.

VIII. Bibliografía

- 1) Sumano LH. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Rev. Vet. Mex.* 1993; 2:24-28.
- 2) Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolones antibacterials: past, present and future perspectives. *Intern J Antimicrob Ag.* 2000; 16:5-15.
- 3) Brown, SA. Fluoroquinolones in animal Health. *J Vet Pharmacol Therap.* 1996; 19:1-14.
- 4) Sumano LH, Gutiérrez OL. Problemática del uso de la enrofloxacin en avicultura en México. *Rev. Vet. Mex.* 2001; 3:41-8.
- 5) Sumano LH, Gutiérrez OL, Zamora MA. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J. Vet Pharmacol Therap.* 2001; 24:309-313.
- 6) Bayer's Submission of facts, information and analyses in response to the notice of opportunity for hearing. Bayer, Germany. 2001.
- 7) Wiuff JC, Lykkesfeldt O, Svendsen FM. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among Salmonella and coliforms in pigs. *Res Vet Science.* 2003; 27: 1-9.
- 8) Van Bambeke, Balzi E, Tulkens, P.M. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:457-470.
- 9) Schimitz, F.J., Fluit, Ad C, Brisse, S., Verhoef, J. Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative in vitro activities of new quinolones against European Staphylococcus aureus isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 1999; 26:281-287.
- 10) Sumano, L. H., Gutierrez, O. L. and Zamora, Q. M. A. 2001. Bioequivalence of six trademarks of enrofloxacin in poultry. *J of Vet Pharm and Ther.* 2001; 24: 1-5.
- 11) Sumano LH, Negron ON, Fernández, G. Consideraciones prácticas y farmacológicas para medicación de antibacterianos en avicultura. *Rev Científica Fac de Ciencias Vet Univ de Zulia.* 2000; 10; 251-66.
- 12) Abdel- el-azis M.I, Asís, M.A., Solinam, F.A., Afify, N.A. Pharmacokinetics evaluation of enrofloxacin in chickens. *British Poultry Science.* 1997;38:164-168.
- 13) Sumano LH, Gutierrez OL, Zamora QM. Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet J.* 2003; 165(2):143-8.

- 14) Gutiérrez OL, Sumano LH, Zamora QM. Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve high maximal serum concentrations. *Vet Rec.* 2002; 16: 350-353.
- 15) Vermeulen BK. Drug administration to poultry. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001;54. 795-803.
- 16) Prescott JF, Baggot JD. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* 2nd Ed. USA: Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1993.
- 17) Randandt KM, Randall MC, Dudley MN. Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management. *Clin. Infectious. Dis.* 1992; 14:272-284.
- 18) Iztok Turel. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews.* 2002; 232: 27-47.
- 19) Morley L, Terry E. Why Is Our Water So Hard On Us?. 2002. Available from: http://www.chem.pacificu.edu/GenChemProjects/pages/Proposals/water_proposals.html
- 20) Lizondo M, Pons M. Physicochemical properties of enrofloxacin. *J Pharm and Biom Anal.* 1997; 15: 1845-1849.
- 21) Otero JL, Mestorino JO, Errecalde N. Enrofloxacin, una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria* 2001; 21: 42-49.
- 22) Vancustem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolones antimicrobials: activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet.* 1990; 80:73-186.
- 23) Bugey M.J, Aziz MA, Soliman FA. Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *Br Poult Sci* 1997; 38: 164-168.
- 24) Abdel A, Anadon A, Martínez-Larranaga MR, Diaz MJ. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res.* 1995; 56(4): 501-506.
- 25) Doménech BJ, Martínez LJ, Plá DJM. *Biofarmacia y farmacocinética.* Vol. II. Biofarmacia. Síntesis S.A. España. 2001.
- 26) Carol KH, Buckley SA, Stanker LH. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. *J of Chrom:* 2001;7: 1-9.

- 27) Bennet JB, Brodie JL, Beher E. J. Simplified accurate method for antibiotic assay. Clin Specimens. Am Soc Microb. 1996; 14; 170-7.
- 28) Quintin McK. G I, Monteiro A. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma. Inflammatory exudate and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. Ant Agents and Chem : 1999 ; 21: 14. 1988-1992.
- 29) Dorresteijn DJ, Van An Miert AS. Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. J of Vet Pharm and Ther: 1988; 11; 33-44.
- 30) Wages D.P. Proper medication procedures. Poultry digest: 1997; 56: 18-19.
- 31) Pesty GM. Water consumption of broiler chickens under commercial conditions. Poultry Science: 1985; 64. 803-808.
- 32) Winchel W. Water Requeriments for poultry. Canada Plan Service. Adapted from Carter and Sneed; 1987.
- 33). Quintana JA. Avitecnia. 3a ed. México. Trillas. 1999.
- 34) Guías para la calidad del Agua Potable. Vol.2. Organización Panamericana de la Salud. EUA. 1987.
- 35) Water treatment plant design. American Society of Civil Engineers. American water works associations. 2ª ed. McGraw Hill. U.SA. 1990.
- 36) Romero RJA. Calidad del agua. Alfaomega. 2ª ed. Méx. 1999.
- 37) Michiels J, Xi C, Verhaert J, Vanderleyden J. The function of Ca^{2+} in bacteria: a role for EF-hand proteins?. Trends in Microbiology: 2002: 10; 87-93.
- 38). Beaty RD. Conceptos de instrumentación y técnicas en espectroscopia de absorción atómica: 1973;12 (6); 151-7.
- 39) Analytical metods for atomic absorption spectrometry Analyst 100. Perkin Elmer. Connecticut. USA. 1996.
- 40) Weeling Peter. Pharmacokinetics: Process Mathematics. American Chemical Association. USA. 1997.
- 41) Küng KJ, Riond L, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. J of Vet Pharm and Ther: 1988; 16, (3). 462-468.
- 42) Cox SK, Cottrell MB, Smith L, Papich MG, Frazier DL, Bartges J. Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species. J Vet Pharm Ther:

- 2004; 27(3):139-46.
- 43) Sumano LH, Gracia MI, Romero V, Ruiz-Ramirez L. The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Veterinary and Human Toxicology*; 1994; 36 (5): 476-477.
- 44) García-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*. Madrid, Spain, 1997, July 6-10;
- 45). Sumano L.H, Gutiérrez OL, Aguilera JR, Rosiles MR, Gracia M.J, Bernard BMJ. Influence of hard water on bioavailability of enrofloxacin in chickens. *Poult Sci*; 2004; 83(5):726-31.
- 46) Aguilera R, Gutiérrez OL, Sumano LH. Enhancement of enrofloxacin serum antibacterial activity in calcium primed broilers. En revision.
- 47) Pletz MW, Petzold AP, Allen OB, Lode H. Effect of calcium carbonate on bioavailability of orally administered Gemifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*; 2003; 47(7). 2158–2160.
- 48) Baquero F, Blázquez J. Evolution of antibiotic resistance. *TREE*; 1997; 2(2): 482-487.
- 49) Avrain L, Humbert F, L'HR. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broiler; association with production type and antimicrobial use. *Vet. Microbiol*; 2003; 96(3): 267-76.
- 50) Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter spp* from humans, pigs, cattle and broilers in Denmark. *Ant Agents and Chem*; 1997; 41 (10); 2244-2250.
- 51) Sumano LH, Ocampo CL. Compositional analysis surveillance of eleven brands of enrofloxacin including Baytril® for veterinary use. *Journal of Veterinary Medicine - Series A*; 1995; 42: 10; 669-673.
- 52) Sumano LH, Gutierrez OL, Zamora MA: Bioequivalencia de seis preparaciones de enrofloxacin en aves. *Memorias de la XXVI Convención Anual de ANECA*. pp 295-298. Abril 25-28. Acapulco Guerrero, 2001.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO A

Cuadro 1. Valores farmacocinéticos de enrofloxacin en aves a diferentes dosis por vía oral por varios autores

Variable	<i>Bugey et al</i> (23).	<i>Abd-el Aziz et al</i> (24).
Dosis (mg/kg)	10	10
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	12.23 \pm 3.68	16.60 \pm 0.55
Vd _{area} (L/kg)	*	*
Vd _{ss} (L/kg)	*	*
α (hr ⁻¹)	*	*
β (hr ⁻¹)	*	0.016 \pm .003
A ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*	2.30 \pm 0.17
B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*	2.48 \pm 0.12
T _{1/2} α (hr)	0.44 \pm 0.11	*
	1.17 \pm 0.40	
T _{1/2} β (hr)	9.24 \pm 2.07	4.29 \pm 0.097
T _{1/2} abs (hr)	0.92 \pm 0.049	*
Cl _{tot} (mL/min//kg)	*	0.36 \pm 0.01
Cp _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.34 \pm 0.44	1.69 \pm 0.082
T _{max} (hr)	1.50 \pm 0.29	2.52 \pm .075
F (%)	*	59.58 \pm 4.16

α = constante híbrida de la fase de distribución; β = constante híbrida de la fase de eliminación T_{1/2} α = vida media de distribución T_{1/2} β = Vida media de la fase de eliminación; T_{1/2} abs = Vida media de absorción; Vd_{area} = volumen de distribución aparente. Vd_{ss} = volumen de distribución en el estado estable; AUC = área bajo la curva concentración/tiempos Cl = depuración; Cp_{max} = concentración plasmática máxima; T_{max} = Tiempo al que se alcanza la Cp_{max} F = biodisponibilidad.

Cuadro 2.

Calidad del agua de bebida para pollo de acuerdo a distintos autores.

Característica	Rango	Característica	Rango
Dureza máxima	180 ppm como CaCO ₃	Nitritos	< 0.05 mg/L
pH	5-7	Nitratos	< 50 mg/L
Fe	< 1 mg/L	Cloruros	< 200
Sulfatos	< 30 mg/l	Fosfatos	< 2 mg/L
Coliformes	< 100 ufc/mL	Mg ²⁺	125 mg/mL (max)
Ca ²⁺	600 mg/L	Na ⁺	50 mg/mL (max)

Cuadro 3.

Tipos de dureza y sales presentes

Tipo de dureza	Metales	Sales
Carbonatada	Ca ²⁺ y/o Mg ²⁺	HCO ₃ y /o CO ₃
No carbonatada	Na ⁺ y/o K ⁺	SO ₄ y/o Cl y/o NO ₃

Cuadro 4.

Clasificación de la dureza de acuerdo a la dureza expresada en ppm de CaCO₃

Denominación	[CaCO₃]
Blanda	0-30 mg/L)
Moderadamente blanda	31-60 mg/L
Moderadamente dura	61- 120 mg/L.
Dura	121-180 mg/L
Muy dura	>181 mg/L.

Cuadro 5.

Cuantificación de calcio por absorción atómica en muestras preparadas de agua muy dura (371 mg/L)

Muestra 1	Absorbancia	mg/L		Muestra 2	Absorbancia	mg/L	
	0.22	93.57			0.14	95.16	
Concentració	Absorbancia			Concentració	Absorbancia		
n				n			
5	0.02	R	0.99	5	0.04	R	0.98
10	0.04			10	0.08		
40	0.11			40	0.14		
200	0.48			200	0.30		
Muestra 3	Absorbancia	mg/L		Muestra 4	Absorbancia	mg/L	
	0.22	97.16			0.22	92.83	
Concentració	Absorbancia			Concentració	Absorbancia		
n				n			
5	0.01	R	0.99	5	0.02	R	0.98
10	0.03			10	0.06		
40	0.12			40	0.17		
200	0.47			200	0.48		
Promedio	93.57		95.16	97.16	92.83		94.68

Cuadro 6.

Cuantificación de magnesio por absorción atómica en muestras preparadas de agua muy dura (371 mg/L)

Muestra 1	Absorbancia	mg/L		Muestra 2	Absorbancia	mg/L	
	0.97	15.37			0.73	15.75	
Concentración	Absorbancia			Concentración	Absorbancia		
1	0.11	R	0.98	1	0.12	R	0.98
2	0.24			2	0.25		
6	0.38			6	0.39		
10	0.61			10	0.46		
Muestra 3	Absorbancia	mg/L		Muestra 4	Absorbancia	mg/L	
	0.94	15.71			0.98	16.1	
Concentración	Absorbancia			Concentración	Absorbancia		
1	0.17	R	0.96	1	0.22	R	0.94
2	0.28			2	0.37		
6	0.59			6	0.40		
10	0.60			10	0.60		
Promedio	15.37		15.75 15.71 16.1	15.73			

Cuadro 7.

Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada y agua muy dura

Concentración en $\mu\text{g/mL}$	Agua desmineralizada	Agua muy dura
	Media de halos de inhibición de crecimiento en mm	Media de halos de inhibición de crecimiento en mm
200	28.22 a	35.39 b
100	15.97 a	29.55 b
50	7.36 a	24.26 b
25	3.42 a	17.78 b
12.5	1.26 a	14.63 b
6.25	0.09 a	10.52 b
3.12	0 a	5.68 b
1.62	0 a	4.33 b
0.81	0 a	1.7 b
0.45	0 a	0.51 b

Literales distintas indican diferencias entre grupos

Cuadro 8.

Media de halos de inhibición del crecimiento *in vitro*

Concentración en µg	Tyrode	Agua muy dura	Agua desmineralizada
	Media de halos de inhibición en mm	Media de halos de inhibición en mm	Media de halos de inhibición en mm
200	17.3 a	35.39 b	28.22 ab
100	14.57 a	29.55 b	15.97 ab
50	8.63 a	24.26 b	7.36 ab
25	4.81 a	17.78 b	3.42 ab
12.5	1.24 a	14.63 b	1.26 ab
6.25	0.04 a	10.52 b	0.09 ab
3.12	0 a	5.68 b	0 ab
1.62	0 a	4.33 b	0 ab
0.81	0 a	1.7 b	0 ab
0.45	0 a	0.51 b	0 ab

Literales distintas indican diferencias entre grupos.

Cuadro 9.**Fracción absorbida y no absorbida de enrofloxacin diluida en agua desmineralizada**

Tiempo (h)	Enrofloxacin en agua desmineralizada dentro del intestino (no absorbida)		Enrofloxacin en agua desmineralizada fuera del intestino (absorbida)	
	Media de los halos de inhibici3n	Concentraci3n en µg/mL	Media de los halos de inhibici3n	Concentraci3n en µg/mL
0.25	36.09	413.7	29.26	342.16
0.5	32.77	385.04	25.17	149.11
0.75	30.18	271.34	22.63	77.3
1	28.02	198.99	17.68	29.38
1.5	25.32	120.64	17.2	26.7
2	22.28	80.2	13.93	12.06
2.5	17.01	25.2	12.12	8.68
3	12.24	9.04	9.91	5.26

Cuadro 10.

Tiempo (h)	Enrofloxacin en agua muy dura dentro del intestino (no absorbida)		Enrofloxacin en agua muy dura fuera del intestino (absorbida)	
	Media de los halos de inhibición	Concentración en $\mu\text{g/mL}$	Media de los halos de inhibición	Concentración en $\mu\text{g/mL}$
0.25	33.75	398.34	24.32	125.17
0.5	31.81	323.23	21.67	58.99
0.75	28.07	203.32	19.28	43.26
1	26.37	146.39	17.84	31.15
1.5	21.41	64.89	15.8	18.82
2	17.61	27.72	11.79	7.73
2.5	13.89	11.84	8.55	3.86
3	9.15	4.5	6.57	2.37

Cuadro 11.

Cantidad de sales ajustadas de acuerdo a las lecturas obtenidas por absorción atómica para producir agua dura con diferentes grados de dureza así como grupo asignado para su evaluación *in vivo*.

Clasificación del agua dura	CaCl₂ (mg)	MgCl₂ · 6H₂O (mg)	Dureza total CaCO₃	Grupo experimental
Blanda o suave	42.38	29.16	16.5	V
Poco dura	89.90	61.85	35	IV
Moderadamente dura	308.30	211.90	120	III
Dura	449.61	309.01	175	II
Muy dura	500.88	344.62	195	I

Figuras

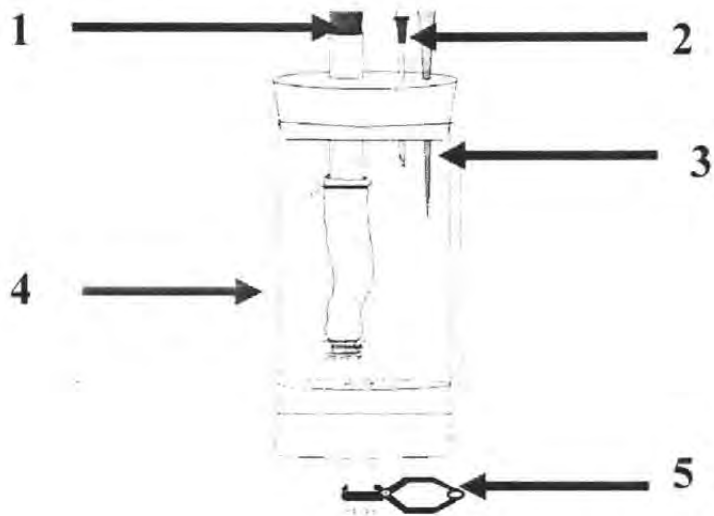


Figura 1. Esquema de la cámara de órganos aislados.

1) Sonda en la que se fijó el extremo proximal del intestino y que sirvió para administrar la enrofloxacin en solución; 2) sonda conectada a bomba para oxigenar la solución Tyrode; 3) sonda para la administración de solución Tyrode a una velocidad de 10 gotas por minuto; 4) cámara de órganos aislados; 5) sonda que sirvió para drenar la solución Tyrode de la cámara de órganos a una velocidad de 10 gotas por minuto.

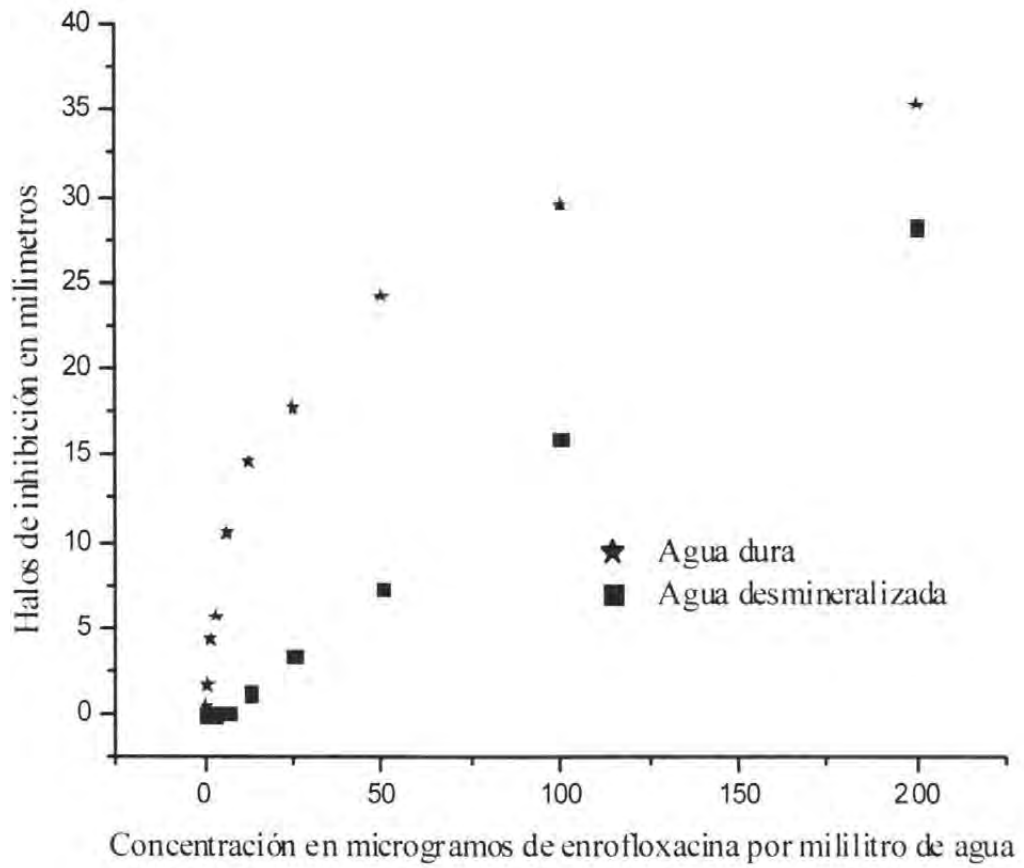


Figura 2. Actividad antimicrobiana *in vitro* de la enrofloxacin diluida en agua muy dura y agua desmineralizada.

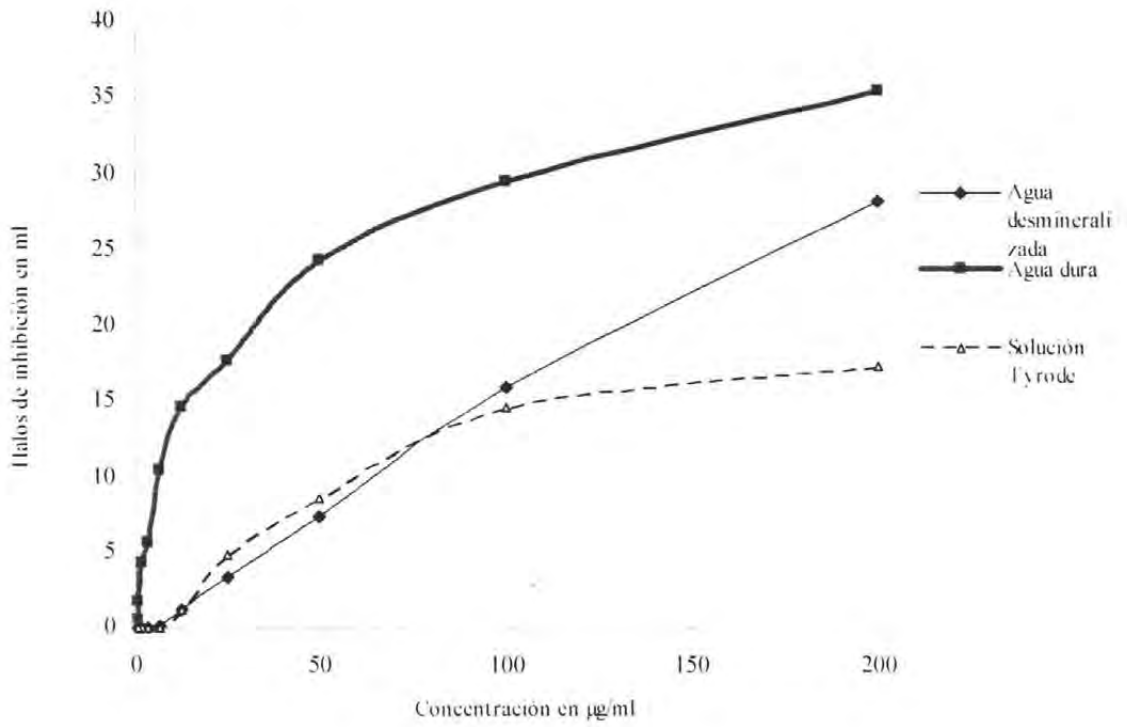


Figura 3. Actividad antimicrobiana de la enrofloxacin diluida en solución Tyrode, en agua muy dura y agua desmineralizada.

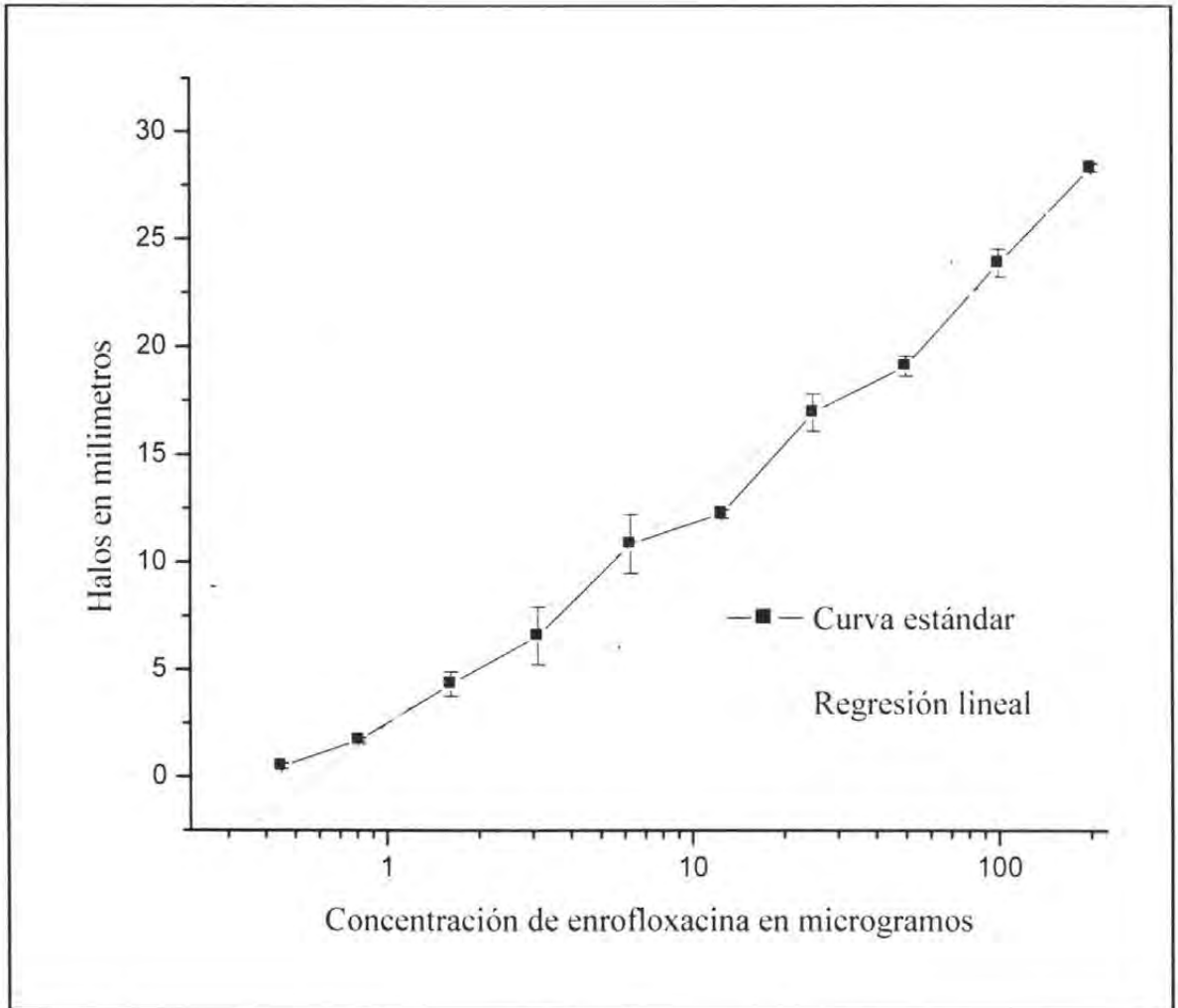


Figura 4. Curva estándar de enrofloxacina diluida en solución Tyrode con un porcentaje de recuperación mayor al 98% y un error intraensayo menor al 0.2%.

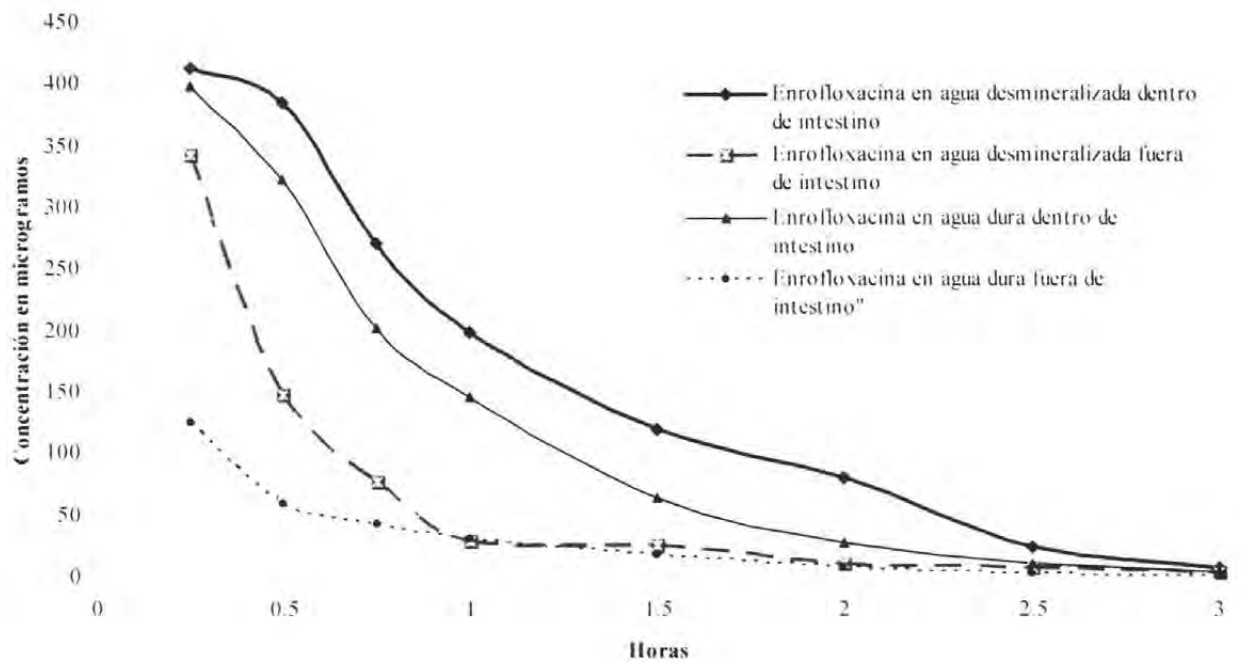


Figura 5. Curva de actividad antimicrobiana expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enrofloxacin diluida en agua muy dura y agua desmineralizada en muestras obtenidas a los 15, 30 y 45 min., 1, 1.5, 2, 2.5, y 3.

ANEXO B

Influence of hard water on the bioavailability of enrofloxacin in broilers.

Sumano LH, Gutierrez OL, Aguilera R, Rosiles MR, Bernard BM, Gracia MJ.

Poult Sci. 2004 May;83(5):726-31.

Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary College, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico.

sumano@servidor.unam.mx

To define the impact that use of different levels of hard water has on the bioavailability of the antibacterial, enrofloxacin, in poultry, an oral bioavailability-pharmacokinetic study of the drug was carried out. Two hundred fifty clinically healthy broilers, divided into 5 groups, were individually dosed orally with 10 mg/kg of enrofloxacin diluted to 0.1%. The enrofloxacin was diluted with water of increasing hardness in accordance with an international grading system. After dosing, blood samples were obtained at predetermined times. Serum was recovered and quantified for enrofloxacin by means of an agar diffusion bacteriological method. The composite serum concentrations of enrofloxacin and metabolites vs. time relationships were analyzed using software for compartmental pharmacokinetics. Results show that there were statistically significant differences in the following pharmacokinetic variables: maximal serum concentrations (C_{max}), area under the time vs. concentration curves, and half-lives of the elimination phases. The means of these values showed a linear decay of C_{max} from one group to the next as water hardness increased. Chemical analysis of water calcium and magnesium ions revealed the formation of coordination groups. Lack of interference with the microbiological activity in vitro of enrofloxacin diluted in hard water indicated that diminished absorption may be partly responsible for reduction in bioavailability. These results stress the need for proper water supply when enrofloxacin is used and point out a factor that must be taken into account when clinical outcomes do not comply with expectations.

1
2
3
4
5
6

Influence Of Hard Water On The Bioavailability Of Enrofloxacin In Broilers.

H. Sumano,* L. Gutiérrez,* R. Aguilera,* R. Rosiles,† M.J. Bernard,‡ J. Gracia‡

* Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary College, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico.

† Department of Toxicology, Veterinary College, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

‡ Department of Pharmacy, School of chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Abbreviation key:

- ATCC = American Type Culture Collection.
- AUC = Area under the curve.
- AUMC = Area under the moment curve.
- $C_{s_{ma}}$ = Maximal serum concentration .
- RT = Residence time.
- RTLT = Residence time to last T.
- T_{max} = Time to reach $C_{S_{max}}$.
- $T_{1/2abs}$ = Absorption half-life.
- $T_{1/2\beta}$ = Elimination half-life.
- β = Hibrid rate constant for terminal elimination phase.

1
2

ABSTRACT

3 To define the impact that use of different levels of hard-water have on the
4 bioavailability of the antibacterial, enrofloxacin, in poultry an oral bioavailability-
5 pharmacokinetic study of the drug was carried out. Two hundred and fifty clinically
6 healthy broilers, divided in five groups were individually dosed oral (PO) with 10
7 mg/kg of enrofloxacin diluted to 0.1%. The enrofloxacin was diluted with water of
8 increasing hardness in accordance with an international grading system. After dosing,
9 blood samples were obtained at pre-determined times. Then serum was recovered and
10 quantified for enrofloxacin by means of an agar diffusion bacteriological method. The
11 composite serum activity/concentrations of enrofloxacin and metabolites vs. time
12 relationships were analysed using software for compartmental pharmacokinetics.
13 Results show that there were statistically significant differences in the following
14 pharmacokinetic variables: maximal serum concentrations ($C_{S_{max}}$), area under the time
15 vs. activity/concentration curves (AUC), and half-lives of the elimination phases
16 ($T_{1/2\beta}$). The mean of all these values showed a linear decay of $C_{S_{max}}$ from one group to
17 the next as water-hardness increased. Chemical analysis of water-calcium and
18 magnesium ions reveals the formation of coordination groups. Lack of reduction of
19 microbiological activity in vitro of enrofloxacin diluted in hard water indicates that
20 diminished absorption may be partly responsible for reduction in bioavailability. These
21 results stress the need for proper water supply when using enrofloxacin and point out a
22 factor that must be taken into account when clinical outcomes do not comply with
23 expectations.

24
25 **Keywords:** Bioavailability, broilers, enrofloxacin, hard-water.

26
27

INTRODUCTION

28 Enrofloxacin is perhaps the most potent antibacterial so far used in veterinary
29 medicine and certainly the last one available for poultry medicine during the last two
30 decades. In many countries, the use of enrofloxacin is restricted only for treatment of
31 severe outbreaks of *Mycoplasma* sp. or bacterial diseases. It must be administered
32 under the supervision of a licensed veterinarian. In contrast, in developing countries it is
33 overused, particularly after the protection of the patent ended (Sumano and Gutierrez,
34 2000).

1 Quality of generic preparations has been shown to be questionable in many cases
2 (Sumano et al., 1994, Sumano and Ocampo, 1995). Predictably, lack of bioequivalence
3 in poultry has been demonstrated for various preparations of enrofloxacin (Sumano et
4 al., 2001). Due to the low cost:benefit ratio derived from developing new antibacterials
5 for the food-animal production sector, research tends to focus on human medicine.
6 Hence, no new antibacterials agents have been introduced for the poultry industry in a
7 long time, and it is unlikely that in the foreseeable future a new antibacterial drug will
8 be available for this sector (Bax et al., 2000; Taylor et al., 2002; Clough, 2002.). This
9 fact, and the fear of cross-resistance of key pathogens (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*
10 and *Campylobacter* sp.) to others fluoroquinolones used in human medicine have
11 prompted a debate in various countries as to whether or not to limit or ban enrofloxacin
12 for the treatment of bacterial infections in poultry (Jørgensen et al., 2002; Pezzotti et al.,
13 2002) In contrast, in many countries, enrofloxacin is being used as the routine choice to
14 treat almost any bacterial diseases in poultry (Sumano and Gutierrez, 2000; Sumano
15 and Gutierrez, 2001). Anecdotally, lack of clinical efficacy due to bacterial resistance
16 has been claimed, but to the best of our knowledge, such data have not been published.

17
18 In our view, rather than bacterial resistance, lack of clinical efficacy may be
19 explained by a combination of other factors, such as the quality of a given preparation
20 and the manner in which the drug is handled. For example: it has been stated that water
21 quality must be ensured to obtain the maximum effect of this and most antibacterial
22 drugs (Russell, 1992; Wages, 1997; Sumano and Gutierrez, 2000). Strategic restriction
23 of water can mimic the bolus dose effect of enrofloxacin desired in broilers, thus
24 obtaining a greater maximal plasma concentration ($C_{S_{max}}$) of the drug (Sumano and
25 Gutierrez, 2000). It has also been shown that increasing the concentration of the drug in
26 the water tank from 0.1 to 0.2% will increase $C_{S_{max}}$ (Sumano and Gutierrez, 2003).

27
28 Previously mentioned actions are based on the assumption that reasonable good
29 water quality is available. To date, the magnitude of the negative effect of water-quality,
30 in particular water-hardness, on the bioavailability of enrofloxacin has not been defined.
31 Hence, the aim of this trial was to characterize such impact in broilers.

32

MATERIAL AND METHODS

The study was given ethical approval by the Internal Committee of Postgraduate Studies of the Veterinary School at the National Autonomous University of Mexico. Two hundred and fifty clinically healthy Arbor-Across broilers, weighing approximately $750 \text{ g} \pm 12 \text{ g}$ were used to assess the bioavailability of enrofloxacin in four grades of water-hardness as classified in Table 1.

Birds had not been exposed to any antibacterial agent for two wk. Animals were randomly divided into five groups of 50 animals each. Each group had three replicates, obtaining in the end three separate plasma vs. time relationships per group. To minimize absorption variability due to enrofloxacin-feed interactions (Randandt et al., 1992), animals were fasted for 6 h before dosing, and water was withdrawn 1 hr prior to the administration of the drug. Three h later, they had immediate access to water and feed. Each chicken was individually weighed and then received a single oral bolus dose of enrofloxacin by means of a semi-rigid tubing attached to a syringe. Enrofloxacin¹ was prepared by adding Baytril® (10% enrofloxacin of Bayer of Mexico) to water containers having different grades of water-hardness to achieve a concentration of 0.1%. Groups were as follows: Group I very hard water (195 ppm); Group II hard water (175 ppm); Group III moderately hard water (120 ppm); Group IV low hard water (35 ppm) and Group V sweet water (16.5 ppm). The dose of 10 mg/kg of a 0.1% solution was directly placed into the proventriculus in a total volume of approximately 7.5 mL/chicken as measured with a 10 mL syringe. Water hardness was achieved as suggested by Morley and Terry (2002) and graded into four categories as presented in Table 1. Animals were observed for 10 to 20 min and only a few birds regurgitated the medication; they were not included in the trial. To achieve a close timing interval between administration of the drug and blood sampling from the wing or jugular vein, assistance from 10 technicians and clock-watch timing was ensured. Thus, differences between the targeted and the actual blood sampling times were never more than 2 min. Approximately 1.5 to 2.0 mL blood samples were taken from three birds per time at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, and 24 h in three separate trials. Usually two, and occasionally three samples were taken from each chicken, being timed as far apart as

¹ Baytril®, from Bayer México

1 possible. Blood samples were immediately centrifuged, approximately 0.6 mL of serum
2 recovered, identified, and frozen until analysed.

3
4 Determination of enrofloxacin on each sample of serum was carried out in
5 triplicates using the quantitative/qualitative microbiological agar diffusion analysis,
6 described by Bennet et al. (1966), using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the test
7 microorganism and 0.1 mL chicken serum as case sample. A reference linear regression
8 between 0.04 µg/mL (regarded as limit of detection) and 10 µg/mL, with a percent
9 recovery of 96 ± 3.5 and intra-assay error smaller than 5%, was achieved.

10
11 The composite serum activity/concentrations of enrofloxacin and metabolites vs. time
12 relationships was analysed using software from PKAnalyst², and fitted best ($r < 0.95$) in
13 model 5. The general formula is:

$$14 \text{ Concentration (time)} = \frac{\text{Dose} * K_{AE} * \text{time}}{\text{Volume}} e^{-K_{AE} * \text{time}}$$

$$15 \text{ Where } K_{AE} = K_{AB} = K_{elim}$$

16
17
18
19 This program reports area under the curve (AUC), hybrid rate constant for
20 terminal elimination phase (β), elimination half-life ($T_{1/2\beta}$), mean residence time (MRT),
21 maximal serum concentration ($C_{S_{max}}$), time to reach $C_{S_{max}}$ (T_{max}), absorption half-life
22 ($T_{1/2abs}$), and the area under the moment curve (AUMC). AUC was confirmed using the
23 trapezoidal method through Microsoft-EXCELL.

24
25 Mean values of serum concentrations of enrofloxacin vs. time from the five
26 groups (I to V), were compared using one-way analysis of variance, through the
27 software package JMP³ while pharmacokinetic values were compared using Bonferroni
28 t-tests, after an analysis of variance.

29
30 Additionally, nuclear magnetic resonance NMR studies were performed using
31 enrofloxacin diluted in sweet and in very-hard water in a Varian Inc. apparatus⁴. Also,

² MicroMath. Scientific Software, SALT Lake City, UTA, USA, 1995.

³ JMP Statistic Mode Visual 1989-1995 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

⁴ Varian Inc. Model Varian Unity INOVA 300 MHz

1 modelling studies of molecular mechanic using the Spartan Pro Wave function Inc.
2 software.

3 4 **RESULTS**

5 Table 2 shows the mean and standard deviation of serum concentration/activity
6 of enrofloxacin in time of the three trials per group and of the five preparations of
7 enrofloxacin. Figure 1 shows these profiles of the concentration/activity of enrofloxacin
8 and active metabolites, where the 13 data points obtained were used to calculate the
9 time-concentration/activity curve. Table 3 lists the relevant pharmacokinetic values
10 derived from compartmental analysis of the data. Comparisons of pharmacokinetics
11 variables using Bon Ferroni t-test among groups showed that there are statistically
12 significant differences in $C_{S_{max}}$, $T_{1/2\beta}$, T_{max} , RT, MRT, AUC and AUMC values
13 decreased from group to the next as a water-hardness increased in a statistically
14 significant manner ($P < 0.05$). Some changes were detected in β value, which may be
15 more related to artefacts of the standard deviation than to real differences. $C_{S_{max}}$ and
16 AUC values showed a linear decay, as shown in Figure 2, where the confidence
17 regression values were respectively $r = 0.972$ and $r = 0.974$.

18
19 Results derived from 1H MNR and molecular mechanics are summarized in
20 Figure 3. Apparently coordination compounds mainly with calcium, and to a certain
21 extent with magnesium are being formed with enrofloxacin in hard water. A
22 coordination compound are usually methal-carbon with one or more ligands, where the
23 carbon is donating electrons to the metal (Miessler et al, 1999).

24 25 **DISCUSSION**

26 When water passes through or over deposits such as limestone, there are
27 higher levels of Ca^{2+} and Mg^{2+} , the basic components that classify water as hard. The
28 term comes from the idea that the calcium and magnesium ions in water combine with
29 soap molecules making it difficult to form suds. Total water-hardness is defined as the
30 sum of all ions derived from calcium and magnesium carbonate, even if it contains
31 other ions, and their concentrations expressed in ppm. In this context, it is safe to state
32 that these results are likely to correlate closely with hard-water obtained under field
33 conditions. Hence, the impact that this particular aspect of water-quality has on the

1 bioavailability of enrofloxacin can be extrapolated to the clinical setting with
2 predictable reduction in the absorption of enrofloxacin and hence in clinical efficacy.

3
4 The linearly reduced values of AUC and $C_{S_{max}}$ and the minimum changes
5 found in the rest of the assessed variables ($T_{1/2\beta}$, RT, MRT, β) suggest that chemical
6 interaction between enrofloxacin and elements of hard water are occurring. As shown in
7 Figure 3, spectra are noticeably different whether enrofloxacin is diluted in sweet water
8 or in hard water, particularly at the level of the protons close to the carboxilate group.
9 This suggests the formation of a new chemical entity. A complex with calcium or
10 magnesium is proposed. The rest of the changes observed in the spectrum reveal a
11 different array of charges as compared with enrofloxacin alone. Molecular mechanic
12 studies reveal that Ca^{++} coordination and Mg^{++} coordination compounds are being
13 formed. The former being more stable than the latter. The probable structure of these
14 coordination compounds is shown in Figure 3. Our in vitro results indicate that hard
15 water interferes very little with the antibacterial activity of enrofloxacin. Hence the
16 coordination groups formed may show a reduced absorption through the GI epithelium.
17 However, it is important to distinguish this unfavourable interaction with either or both,
18 magnesium and calcium, with the proposed manner in which various fluoroquinolone-
19 metal complexes retain or even gain antibacterial activity (i.e., copper, bismuth). In this
20 latter case, it has been postulated that the mechanism of action of quinolones could be
21 mediated by a transition metal-ion (Turel, 2002).

22
23 Summarizing, water-hardness reduces bioavailability of enrofloxacin in
24 broilers. In developing countries water quality is not regarded as an important limiting-
25 factor to select the area where a poultry farm will be located. Yet it is in these countries
26 where enrofloxacin is overused. Proper regulations to handle enrofloxacin worldwide
27 are mandatory if the outcome of a major public health problem wants to be avoided, and
28 to extend the useful life of this antibacterial agent.

REFERENCES

1
2 Bax, R., Mullan, N., and Verhoef, J. 2000. The millennium bugs — the need for
3 and development of new antibacterials. *International J. Antimicrob. Agents.* 16:51-59.

4
5 Bennet, J. B., Brodie, J. L., Benner, E. J., and Kirby, W. M. 1966. Simplified
6 accurate method for antibiotic assay. *Clinical. Specimens. Am. Soc. Microb.* 14:170-
7 177.

8
9 Clough, J. 2002. Anti-infectives in the 21st century. *Drug Discovery Today.*
10 7:1036-1038

11
12 Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, R., Henderson, P., Wareing D. R. A.,
13 Bolton, F. J. Frost, J. A., Ward, L., and Humphrey, T. J. 2002. Prevalence and numbers
14 of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling
15 methods. *International J. Food Microb.* 76:151-164.

16
17 Miessler, G. L., and Tarr, D. A. 1999. *Inorganic Chemistry*, 2nd ed. Book News,
18 Inc, Portland, OR..

19
20 Morley, L. and Terry, E. 2002. Why Is Our Water So Hard On Us?. Available:
21 http://www.chem.pacificu.edu/GenChemProjects/pages/Proposals/water_proposals.html

22
23 Pezzotti, G. A., Luzzi, S. I, Mioni, R., Milan, M., and Perin, R. 2002.
24 Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*
25 *coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International J. Food Microb.* 21:256.

26
27 Randandt, K. M., Randall, M. C., and Dudley, M. N. 1992. Interactions of
28 fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and
29 management. *Clin. Infectious. Dis.* 14:272-284.

30
31 Russel, I. D. 1992. Proper water medication with good water systems. *Poultry*
32 *Dig.* 51:40-48.

1 Sumano, L. H., Gracia, M. I., Romero, V., and Ruiz-Ramirez, L. 1994. The use
2 of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Vet. Hum. Toxicol.* 5:476-477.

3
4 Sumano, L. H., and Gutiérrez, O. L. 2000. Problemática del uso de la
5 enrofloxacin en la avicultura en México. *Vet. Mex.* 2:137-145.

6
7 Sumano, L. H., and Gutierrez, O. L. 2001. Strategic administration of
8 enrofloxacin in poultry to achieve higher serum concentrations. Pages 45-48 in
9 Proceedings of the Fiftieth Western Poultry Disease Conference. University of Davis
10 California, Davis, Cal.

11
12 Sumano, L. H., Gutierrez, O. L., and Zamora, Q. M. A. 2001. Bioequivalence of
13 six trademarks of enrofloxacin in poultry. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 24:1-5.

14
15 Sumano, L. H., and Gutierrez, O. L. 2003. Strategic administration of
16 enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet J.*
17 165:143-148.

18
19 Sumano, L. H., and Ocampo, C. L. 1995. Compositional analysis surveillance of
20 eleven trade of eleven trade brands of enrofloxacin including Baytril, for veterinary use.
21 *J. Vet. Med. A.* 42:669-673.

22
23 Taylor, P. W., Stapleton, P. D., and Luzio, J. P. 2002. New ways to treat
24 bacterial infections. *Drug Discovery Today.* 7:1086-1091.

25
26 Turel, I. 2002. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents.
27 *Coordination Chem Rev.* 232:27-47.

28
29 Wages, D.P. 1997. Proper medication procedures. *Poultry Dig.* 56:18-19.

Table 1. Classification for water hardness and chemical components added to achieve different grades of hardness .

Water classification (ppm of CaCO ₃) ¹	Experimental group	Components/L		Total hardness achieved (ppm)
		CaCl ₂ (g)	MgCl ₂ 6H ₂ O (g)	
Sweet (0 - 17.1 ppm)	V	0.022	0.010	16.5
Low hard (20 – 60 ppm)	IV	0.0475	0.021	35
Moderately hard (60 – 120 ppm)	III	0.115	0.071	120
Hard (120 – 180 ppm)	II	0.235	0.107	175
Very Hard (180 and over ppm)	I	0.266	0.121	195

¹Water Clasification. Morley and Terry, 2002.

Table 2. Mean \pm SD of the serum activity/concentrations of enrofloxacin in poultry ($\mu\text{g/mL}$) with different grade of hardness (group I, II, III, IV and V)⁵ after a single bolus of enrofloxacin (10 mg/kg)⁶.

Time (hours)	Group I ^a \pm SD	Group II ^a \pm SD	Group III ^b \pm SD	Group IV ^c \pm SD	Group V ^d \pm SD
0.5	0.46 \pm 0.04 ^a	0.517 \pm 0.05 ^a	0.62 \pm 0.04 ^b	0.71 \pm 0.04 ^c	0.85 \pm 0.05 ^d
1	1.28 \pm 0.15 ^a	1.37 \pm 0.191 ^{ab}	1.48 \pm 0.181 ^{abc}	1.56 \pm 0.0124 ^{bc}	1.68 \pm 0.24 ^c
1.5	1.64 \pm 0.42 ^a	1.7 \pm 0.461 ^a	2.12 \pm 0.451 ^{ab}	2.47 \pm 0.0124 ^{bc}	2.84 \pm 0.51 ^c
2	2.17 \pm 0.27 ^a	2.29 \pm 0.311 ^{ab}	2.547 \pm 0.436 ^b	2.94 \pm 0.0124 ^c	3.57 \pm 0.36 ^d
2.5	3.21 \pm 0.5 ^a	3.32 \pm 0.541 ^{ab}	3.42 \pm 0.666 ^{ab}	3.54 \pm 0.763 ^{ab}	3.94 \pm 0.57 ^b
3	2.78 \pm 0.71 ^a	2.95 \pm 0.41 ^{ab}	3.64 \pm 0.535 ^{bc}	3.87 \pm 0.632 ^c	4.07 \pm 0.78 ^c
3.5	2.12 \pm 0.52 ^a	2.54 \pm 0.545 ^{ab}	2.67 \pm 0.67 ^{ab}	3.04 \pm 0.767 ^{bc}	3.75 \pm 0.59 ^c
4	1.52 \pm 0.35 ^a	1.75 \pm 0.375 ^{ab}	2.12 \pm 0.5 ^b	2.24 \pm 0.597 ^b	3.08 \pm 0.42 ^b
5	1.2 \pm 0.14 ^a	1.34 \pm 0.165 ^a	1.87 \pm 0.24 ^b	2.01 \pm 0.337 ^b	2.64 \pm 0.21 ^c
6	0.85 \pm 0.12 ^a	0.89 \pm 0.145 ^a	1.21 \pm 0.17 ^b	1.54 \pm 0.1797 ^c	1.98 \pm 0.19 ^d
8	0.21 \pm 0.04 ^a	0.31 \pm 0.065 ^b	0.87 \pm 0.047 ^c	0.97 \pm 0.0567 ^d	1.24 \pm 0.11 ^c
12	0 ^a	0 ^a	0.31 \pm 0.012 ^b	0.51 \pm 0.0217 ^c	0.62 \pm 0.025 ^d
24	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

⁵ Group I very hard water (195 ppm); Group II hard water (175 ppm); Group III moderately hard water (120 ppm); Group IV low hard water (35 ppm) and Group V sweet water (16.5 ppm).

⁶ Different letters indicate statistically significant difference ($P < 0.05$)

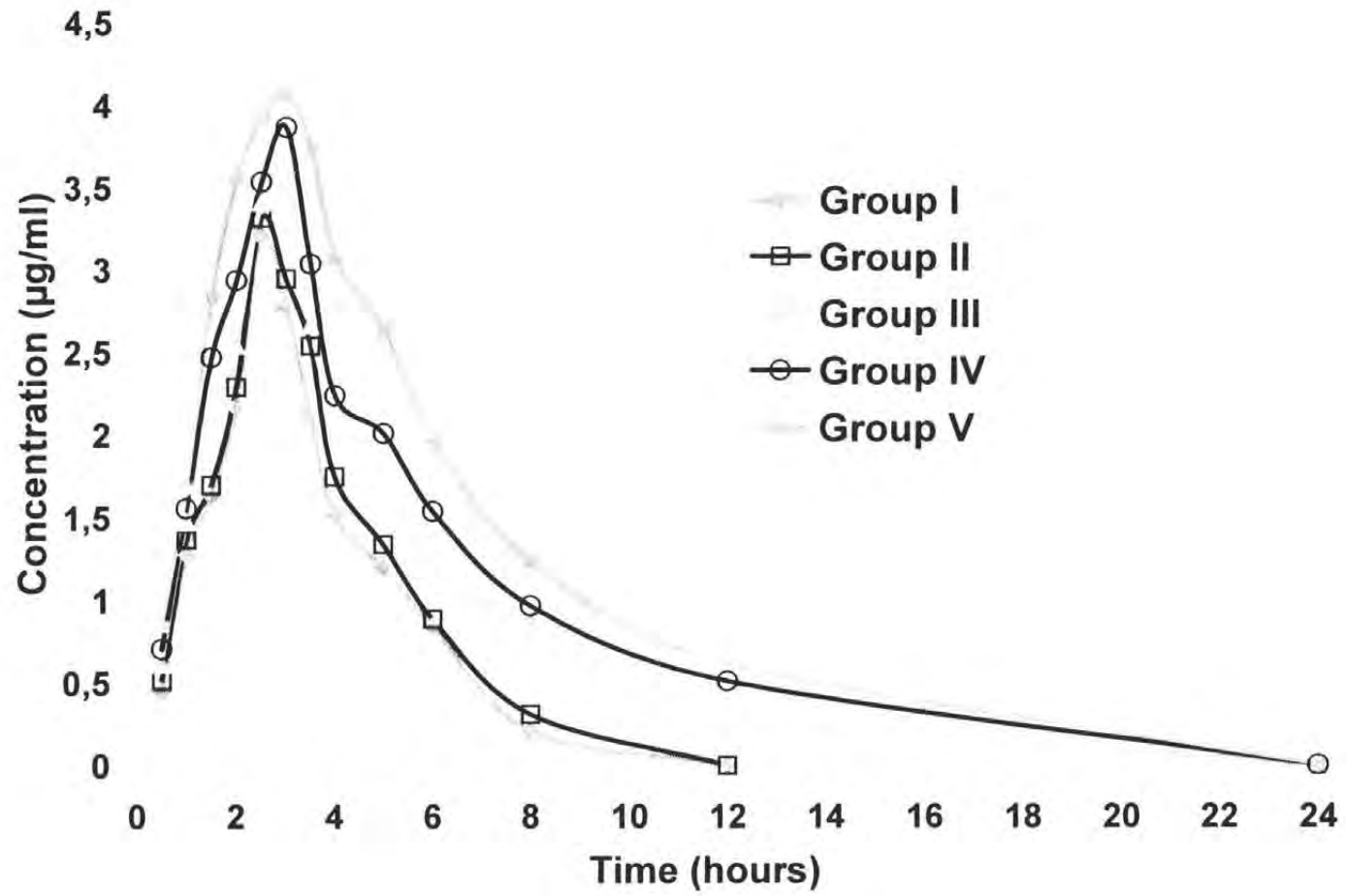


Figure 1. Mean serum concentration/activities vs. time variables of enrofloxacin obtained in chicken after a single oral bolus dose of the drug diluted to 0.1% with different grades of water-hardness. Group I. very hard water (195 ppm); Group II. hard water (175 ppm); Group III. hard water (120 ppm); Group IV moderately hard water (65 ppm); Group V sweet water (16.5 ppm). All preparations were dose at 10 mg/kg through a cannula directly placed into the proventriculus.

Table 3. Pharmacokinetic variables of enrofloxacin obtained in chicken after a single oral bolus dose of the drug diluted to 0.1% with different grades of water-hardness (groups I to IV)⁷ and in sweet water (group V)⁷. All preparations were dose at 10 mg/kg through a cannula directly placed into the proventriculus⁸

Variable	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
β	0.069 ± 0.005 ^a	0.067 ^a ± 0.004	0.070 ^a ± 0.004	0.071 ^a ± 0.004	0.072 ^a ± 0.005
T _{1/2β} (h)	1.55 ^b ± 0.14	1.6 ^b ± 0.12	1.76 ^a ± 0.09	1.78 ^a ± 0.14	1.9 ^a ± 0.10
C _{Smax} (µg/mL)	2.22 ^c ± 0.21	2.39 ^c ± 0.26	2.73 ^b ± 0.25	2.99 ^b ± 0.31	3.51 ^a ± 0.28
T _{max} (h)	2.24 ^a ± 0.20	2.31 ^a ± 0.21	2.56 ^a ± 0.19	2.57 ^a ± 0.33	2.54 ^a ± 0.25
AUC	13.58 ^c ± 3.35	15.03 ^{bc} ± 2.89	18.86 ^b ± 3.02	20.99 ^b ± 3.87	26.21 ^a ± 3.25
AUMC	61.11 ^d ± 17.54	69.60 ^{cd} ± 16.04	95.80 ^c ± 17.54	108.2 ^b ± 18.71	143.89 ^a ± 18.47
RT	4.49 ^b ± 0.69	4.62 ^b ± 0.57	5.07 ^{ab} ± 0.59	5.15 ^{ab} ± 0.71	5.48 ^{ab} ± 0.67
RTL _T	11.07 ^a ± 0.49	12.26 ^a ± 0.49	5.06 ^b ± 0.61	5.13 ^b ± 0.51	5.45 ^b ± 0.57

Hibrid rate constant for terminal elimination phase (β); elimination half-life (T_{1/2β}); maximal serum concentration (C_{Smax}); time to reach C_{Smax} (T_{max}); absorption half-life (T_{1/2abs}); area under the curve (AUC); area under the moment curve (AUMC); Residence time (RT) and residence time to last T (RTL_T).

⁷ Group I very hard water (195 ppm); Group II hard water (175 ppm); Group III moderately hard water (120 ppm); Group IV low hard water (35 ppm) and Group V sweet water (16.5 ppm).

⁸ Different letters indicate statistically significant difference (P < 0,05)

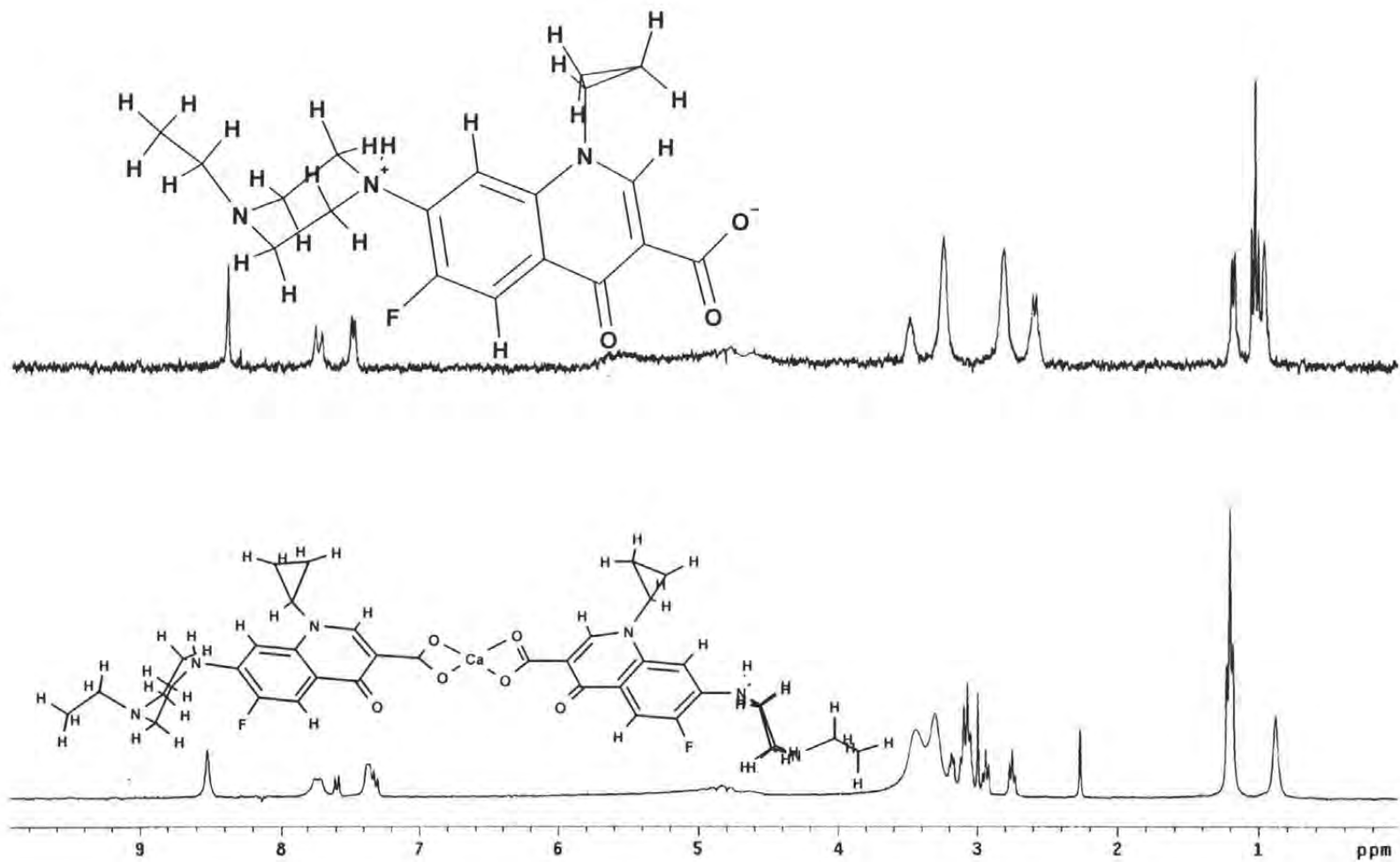


Figure 3. Nuclear magnetic resonance spectra of enrofloxacin dissolved in sweet water (top) and in hard-water (bottom), and proposed formation of a Ca^{++} coordination compound .

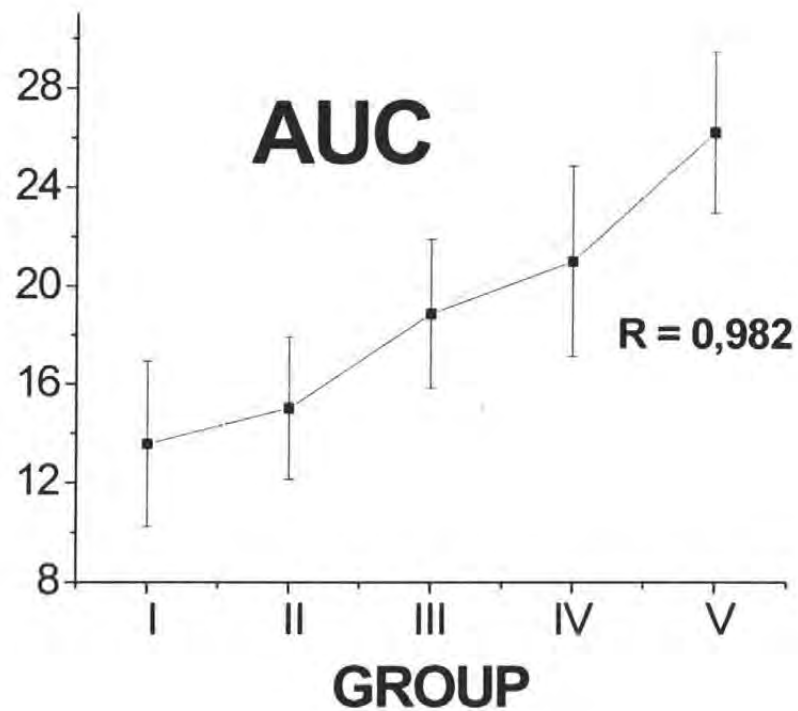
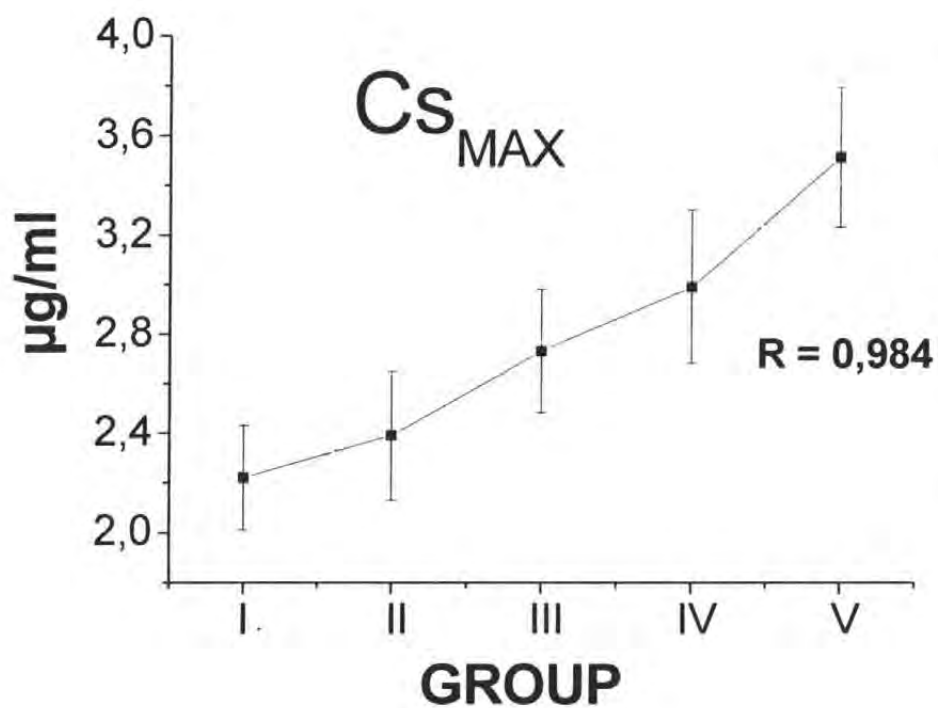


Figure 2. Linear regressions for the reduction in $C_{s_{max}}$ and AUC of enrofloxacin diluted to 0.1% in increasing water-hardness and in sweet-water and administered to chickens as a 10 mg/kg oral bolus dose.

ANEXO C

Research in Veterinary Science

EDITORIAL OFFICE: P.O. BOX 993, 1000 AZ AMSTERDAM, THE NETHERLANDS

Dr. L.H. Sumano
National Autonomous Univ. of Mexico
School of Veterinary Medicine
Physiology and Pharmacology Dept.
04510 Mexico City
Mexico

Re: YRVSC 437

Amsterdam, January 24, 2005

Dear Dr. Sumano,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated the manuscript *Enhancement of the enrofloxacin plasma antibacterial activity- serum concentration by calcium priming broilers* by Aguilera, R., Gutiérrez, O.L. and Sumano, L.H..

The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication after major revision.

The enclosed comments should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revised manuscript, you will need to supply a covering letter in which you list all the changes you have made to the manuscript, and in which you detail your responses to all the comments passed by the reviewer(s) and the Editor. Should you disagree with any comment(s), please explain why. If there is an annotated copy of your manuscript enclosed with this letter, please be sure to return it with your revision.

In order to facilitate the further processing of your manuscript, please take into account each of the points mentioned in the enclosed Checklist for Authors. Additionally, please quote the original reference number.

I look forward with interest to receiving three paper copies of your revised manuscript and a disk.

Yours sincerely,



Editorial Office Research in Veterinary Science

Mr. F.D. Mesman

**ENHANCEMENT OF ENROFLOXACIN SERUM ANTIBACTERIAL ACTIVITY
IN CALCIUM PRIMED BROILERS**

Aguilera, R., Gutiérrez, O. L., Sumano, L. H.*

Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary College, National Autonomous
University of Mexico. Mexico City 04510, Mexico.

* Correspondence author:

Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary College,
National Autonomous University of Mexico.
Mexico City 04510, Mexico.
Phone: + (52) 5 56 22 59 08
E-mail: sumano@servidor.unam.mx

SHORT TITLLE:

ENROFLOXACIN IN CALCIUM PRIMED BROILERS

Abstract

The aim of this trial was to assess the effect that calcium gluconate priming of broilers has on the antibacterial activity of a standard dose of enrofloxacin. Hence, a series of oral pharmacokinetic studies were carried out in four groups of broilers medicated individually through an oral cannula as follows: group A, medicated only with enrofloxacin 10 mg/kg; group B, receiving immediately one after the other, calcium gluconate (200 mg/kg) and enrofloxacin 10 mg/kg; group C, dosed first with calcium gluconate (200 mg/kg) and 1 hr later enrofloxacin (10 mg/kg); and group D, dosed first with calcium gluconate (200 mg/kg) and 2 h later enrofloxacin (10 mg/kg). Broilers were bled at different times after the dose of enrofloxacin and antibacterial activity, measured as concentration of enrofloxacin, was measured by an agar diffusion assay. Results revealed that group D the greatest values of maximum serum concentration ($C_{s_{max}}$), area under the concentration vs. time curve (AUC) and area under the moment curve (AUMC). These values were statistically higher than the corresponding ones derived from groups A, B and C ($P < 0.05$). Taking $C_{s_{max}}$ and AUC values of group A as reference baseline, an increase of 24 % and 50% respectively was obtained in group D. Group B had the lowest $C_{s_{max}}$, AUC, AUMC and elimination half life ($T_{1/2\beta}$) and these values were statistically different from groups A, C and D ($P < 0.05$). The $T_{1/2\beta}$ was statistically longer in groups C and D as compared with A and B, and the former groups were also different between each other ($P < 0.05$). These results show that if calcium gluconate is first dosed to broilers and two hours later enrofloxacin is administered (as in group D), a more pronounced antibacterial activity of enrofloxacin can be obtained. A challenge of this sequential dosing scheme in a field trial may reveal its clinical value.

Keywords: Enrofloxacin; Calcium; Concentrations; Broilers

Introduction

Enrofloxacin is one of the most potent antibacterial agents so far used in the poultry industry. After its introduction more than 20 years ago, no truly novel family has been proposed for poultry medicine and it is unlikely that, in the foreseeable future, a new family of antibacterial drugs will be available for this sector (Engberg et al., 2001; Stanley, 2001; Barrett and Barrett, 2003). Hence, it is understandable that the use of enrofloxacin should be restricted only for treatment of severe outbreaks of *Mycoplasma* sp. or bacterial diseases, and should be administered only by a licensed veterinarian. However, in developing countries it is overused, particularly after the patent protection ended (Sumano and Gutierrez, 2000). Also the quality of generic preparations of enrofloxacin has been shown to be questionable in many cases (Sumano et al., 1984; Sumano and Ocampo, 1985), and lack of bioequivalence of this drug in poultry has been demonstrated (Sumano et al., 2001). Considering that enrofloxacin is a concentration-dependant antibacterial, attempts to increase maximum plasma concentrations ($C_{p_{max}}$) have been made, i.e., using capsaicin (Sumano and Gutierrez, 2002) or doubling its concentration in the drinking water of broilers from 0.1 to 0.2%, while maintaining the dose in 10 mg/kg (Sumano et al., 2003). Conversely, it has been shown that hard-water reduces bioavailability of this drug in broilers, apparently due to reduced absorption of enrofloxacin-dimers formed with water calcium (Sumano et al., 2004). Paradoxically, antibacterial activity *in vitro* is enhanced when dilutions are made, precisely, in hard-water (unpublished data). In fact, only in the presence of the magnesium metal ion, quinolones are able to interact efficiently with gyrase or the gyrase-DNA complex (Lecomte et al., 1998; Sissia et al., 1998; Michiels, 2002; Noble, 2002). Hence, it appears that calcium inhibits absorption of enrofloxacin from the gastrointestinal tract of birds, but it may promote its antibacterial activity if additional quantities of Ca^{++} are made available in plasma by administering first calcium-gluconate, allowing its absorption, and then administering enrofloxacin. Hence the aim of this trial was to test whether or not calcium-primed chicken show an enhanced serum antibacterial activity after a standard dose of enrofloxacin.

Material and methods

The study was given ethical approval by the Internal Committee of Postgraduate Studies of the Veterinary School at the National Autonomous University of Mexico. Four hundred and sixty eight clinically healthy Arbor-Across broilers, weighing approximately $750 \text{ g} \pm 12 \text{ g}$ were used to assess the serum antibacterial activity of enrofloxacin expressed as concentration. Four types of treatment were studied: group A medicated with enrofloxacin (Baytril®, Bayer – Mexico); group B receiving first a dose of 200 mg/kg of calcium-gluconate (equivalent to 59.80 mg/broiler) in a total volume of 3 ml and immediately enrofloxacin as in group A; group C dosed with calcium-gluconate as in group B and 1 h later enrofloxacin as in previous groups; finally group D was treated as group C, but enrofloxacin was administered 2 h after calcium-gluconate priming. Each treatment was repeated 3 times providing 39 birds for each replicate thus obtaining three separate serum concentration v.s. time relationships per group.

Prior to commencement of the experiment the broilers had not been exposed to any antibacterial agent for two weeks, were deprived of feed overnight for six hours and water for one hour and then randomly distributed to the four groups. After individual medication, broilers had immediate access to water and three hours later access to food was ensured.

Each chicken was individually weighed and then received either calcium-gluconate and/or enrofloxacin as single oral bolus dose by means of a semi-rigid tubing attached to a syringe, directed into the proventriculus. Enrofloxacin was prepared as a 0.1% w/v solution and final volumes ranging from 7 to 8 ml prepared and administered to adjust a dose of 10 mg/kg of bird. After administration, the birds were observed for up to 20 min and the few that showed regurgitation (4 birds in all) were removed from the experiment.

For blood sampling 1.5 to 2.0 ml blood were taken from three birds from each treatment at the following times after treatment 25, 30 and 45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 hours. To achieve a close timing interval between administration of the drug and blood sampling from the wing or jugular vein, assistance from 10 technicians and clock-watch timing were ensured. Thus, differences between the targeted and the actual blood sampling

times were never more than 2 min. Blood samples were immediately centrifuged and approximately 0.6 ml of serum recovered, identified, and frozen until analyzed.

Determination of the antimicrobial activity of the serum samples was achieved by the microbiological agar diffusion technique as described by Bennet et al. (1966) and using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the test organism. A correlation between increasing concentrations of enrofloxacin vs. diameter of the inhibition halos are expressed as concentration of antibacterial activity or simply, as concentration in µg/ml. The limit of quantification was 0.04 µg/ml identified by means of enrofloxacin fortified serum samples, which correspond to 6.5 mm of inhibition halo as measured by an electronic digital calliper. This value corresponds to the lower limit of the calibration line, whose correlation coefficient of the standard solution of enrofloxacin was $r = 0.965$ using linear regression by Origin 6.0 software. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation (3% and 4.5%, respectively) were calculated from 5 repetitions.

The serum concentrations of enrofloxacin vs. time relationships were analyzed using compartmental pharmacokinetics through the software from PKAnalyst¹, and fitted best ($r < 0.95$) in model 5. The general formula is:

$$\text{Concentration (time)} = \frac{\text{Dose} * K_{AE} * \text{time}}{\text{Volume}} e^{-K_{AE} * \text{time}}$$

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

This program reports area under the curve (AUC), hybrid rate constant for terminal elimination phase (β), elimination half-life ($T_{1/2\beta}$), mean residence time (MRT), maximal serum concentration ($C_{s_{max}}$), time to reach $C_{s_{max}}$ (T_{max}), absorption half-life ($T_{1/2abs}$), and the area under the moment curve (AUMC). AUC was confirmed using the trapezoidal method through Microsoft-EXCELL.

¹ MicroMath. Scientific Software, SALT Lake City, UTA, USA.1995.

Mean values of serum concentrations of enrofloxacin vs. time from the four groups (A, B, C and D), were compared using one-way analysis of variance, through the software package JMP², while pharmacokinetic values were compared using Bonferroni t-tests, after an ANOVA analysis.

Results

Table 1 and figure 1 show the mean and standard deviation of serum antibacterial activity of enrofloxacin and active metabolites, expressed as concentration vs. time. Table 2 lists the relevant pharmacokinetic values derived from compartmental analysis of data and results from statistical comparisons are highlighted using different letters within rows. Group D had values of maximum serum concentration ($C_{S_{max}}$), area under the concentration vs. time curve (AUC) and area under the moment curve (AUMC), statistically higher than the corresponding ones derived from groups A, B and C ($P < 0.05$). Group B had the lowest $C_{S_{max}}$, AUC, AUMC and elimination half life ($T_{1/2\beta}$) values and were statistically different from groups A, C and D ($P < 0.05$). Taking $C_{S_{max}}$ and AUC values of group A as reference baseline, an increase of 24 % and 50% respectively can be obtained in group D. $T_{1/2\beta}$ was statistically longer in groups C and D as compared with A and B, but the former groups were also different between themselves ($P < 0.05$).

Discussion

The fear of cross-resistance of key pathogens (*Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Campylobacter* sp.) to other fluoroquinolones used in human medicine have prompted a debate in various countries as to whether or not to limit or ban enrofloxacin for the treatment of bacterial infections in poultry (Jørgensen et al., 2002; Pezzotti et al., 2003). In contrast, in many countries, enrofloxacin is being used as the routine choice to treat almost any bacterial diseases in poultry (Sumano and Gutierrez, 2000). Anecdotally, lack of

² JMP Statistic Mode Visual 1989-1995 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

clinical efficacy due to bacterial resistance has been claimed, but to the best of our knowledge, such data has not been published. In our view, rather than bacterial resistance to enrofloxacin, lack of clinical efficacy may be explained by a combination of other factors, such as the quality of a given preparation (Sumano et al., 1984; Sumano and Ocampo, 1985) and the manner in which the drug is handled. For example: strategic restriction of water, prior to administering enrofloxacin through the drinking water, should be implemented to obtain a greater $C_{S_{max}}$ value, a key feature to achieve best clinical efficacy with a concentration-dependant antibacterial (Charleston et al., 1998) and to drastically reduce the appearance of resistant strains of key pathogens (Florea and Nightingale, 2004). These maneuvers can offer favorable clinical results based on the assumption that reasonable good water quality is available (Russell, 1992; Wages, 1997). Water-hardness reduces bioavailability of enrofloxacin by formation of dimers (Sumano et al., 2004); yet, the presence of calcium in water as vehicle enhances antibacterial action *in vitro*.

These results show that calcium inhibits the absorption of enrofloxacin from the gastrointestinal tract (group B), but if gastrointestinal absorption of calcium is allowed in a two-hour period; presumably, higher concentrations of serum calcium will enhance the antibacterial activity of enrofloxacin and metabolites, at least at the level of the central compartment. It will be of interest to assess whether the potential formation of calcium-dimers in serum can affect tissue distribution of enrofloxacin and consequently its clinical efficacy. Hence, it will be of interest to carry out controlled clinical trials to assess whether or not the maneuver of calcium priming chicken has any tangible clinical value.

Table 1.

Mean \pm 1 standard deviation of serum antibacterial activity of enrofloxacin and active metabolites expressed as serum concentration profiles in broilers from four trials: A: enrofloxacin 10 mg/kg; B: calcium gluconate (200 mg/kg) and enrofloxacin 10 mg/kg administered simultaneously; C: calcium gluconate (200 mg/kg) and 1 hr later enrofloxacin (10 mg/kg); D: calcium gluconate (200 mg/kg) and 2 h later enrofloxacin (10 mg/kg).

Time hours	Group							
	A		B		C		D	
	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	\pm SD	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	\pm SD	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	\pm SD	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	\pm SD
0.25	1.38	0.14	0	0	0	0	0.54	0.087
0.5	1.42	0.12	0	0	0	0	0.85	0.095
0.75	1.31	0.08	0	0	0.85	0.05	1.5	0.12
1	1.37	0.08	0.75	0.09	1.56	0.074	1.2	0.11
1.5	1.86	0.09	1.08	0.08	1.34	0.086	1.98	0.23
2	2.13	0.2	1.13	0.09	1.97	0.105	2.64	0.34
3	1.52	0.07	1.42	0.078	1.47	0.046	1.64	0.21
4	1.43	0.04	1.46	0.11	1.57	0.078	1.81	0.25
6	0.86	0.03	0.71	0.04	0.95	0.024	1.17	0.16
8	0.35	0.03	0.43	0.06	0.72	0.026	0.85	0.16
10	0.06	0.01	0.26	0.03	0.4	0.012	0.51	0.09
12	0	0	0.04	0.005	0.03	0.006	0.24	0.08
24	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2.

Mean \pm 1 standard deviation pharmacokinetic variables of enrofloxacin in broilers from four trials: A: enrofloxacin 10 mg/kg; B: calcium gluconate (200 mg/kg) and enrofloxacin 10 mg/kg administered simultaneously; C: calcium gluconate (200 mg/kg) and 1 hr later enrofloxacin (10 mg/kg); D: calcium gluconate (200 mg/kg) and 2 h later enrofloxacin (10 mg/kg). Different letter in a row point out statistically significant values among groups ($P < 0.05$).

Variable	Group							
	A		B		C		D	
	X	\pm SD	X	\pm SD	X	\pm SD	X	\pm SD
$K_{1/2ELIM}$	2.38 ^a	0.25	2.09 ^a	0.31	1.78 ^a	0.58	3.13 ^b	0.94
$K_{1/2AB}$	0.63 ^b	0.08	2.10 ^a	0.26	1.79 ^a	0.54	0.86 ^b	0.09
$T_{1/2\beta}$	1.66 ^a	0.13	1.48 ^a	0.09	1.94 ^b	0.19	3.30 ^c	0.37
T_{MAX}	1.64 ^a	0.21	3.03 ^b	1.29	2.58 ^{ab}	0.74	2.21 ^{ab}	0.17
CS_{MAX}	2.13 ^a	0.2	1.46 ^b	0.11	1.97 ^a	0.105	2.64 ^c	0.34
AUC:	10.10 ^{ab}	1.25	8.36 ^a	1.07	11.12 ^b	1.74	15.17 ^c	1.83
AUMC	57.29 ^a	3.42	46.62 ^b	4.35	58.14 ^a	5.21	81.87 ^c	7.21
RT	4.34 ^a	1.74	6.06 ^a	1.87	5.16 ^a	1.12	5.76 ^a	2.10

$K_{1/2ELIM}$ = Elimination constant; $K_{1/2AB}$ = Absorption constant; $T_{1/2\beta}$ = elimination half life; T_{MAX} = Time maximal concentration; CS_{MAX} = maximal concentration; AUC = area under time/concentration curve; AUMC = area under the moment curve and RT = residence time.

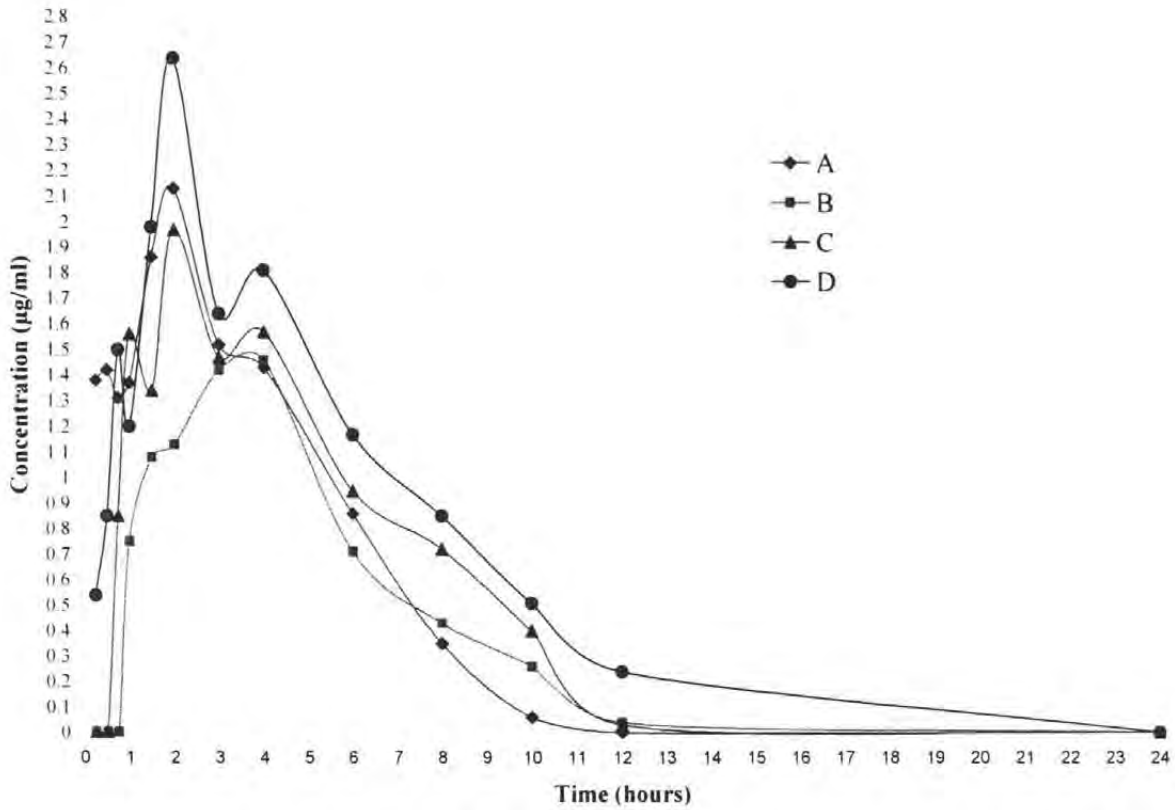


Figure 1. Mean serum antibacterial activity of enrofloxacin and active metabolites, expressed as serum concentration profiles in broilers from four trials: A: enrofloxacin 10 mg/kg; B: calcium gluconate (200 mg/kg) and enrofloxacin 10 mg/kg administered simultaneously; C: calcium gluconate (200 mg/kg) and 1 hr later enrofloxacin (10 mg/kg); D: calcium gluconate (200 mg/kg) and 2 h later enrofloxacin (10 mg/kg).

References

- Barrett, C.T., Barrett, J.F., 2003 Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Current Opinion in biotechnology* 14, 621-626.
- Bennet, J.B., Brodie, J.L., Benner, E.J., Kirby, W.M. 1966 Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical Specimens. American Society for Microbiology* 14, 170-177.
- Charleston, B., 1998 Comparison of the efficacies of three fluoroquinolone antimicrobial agents, given as continuous or pulsed-water medication, against *Escherichia coli* infection in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 83-87.
- Engberg, J., Aarestrup, F.M., Taylor, D.E., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I., 2001 Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. Coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases* 7, 24-34.
- Florea, N.F., Nightingale, C.H., 2004 Review of the pharmacodynamics of antibiotic use in animal food production. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49, 105-108
- Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., Humphrey, T.J. 2002 Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 151-164.
- Lecomte, S., Moreau, N.J., Chenon, M.T., 1998 NMR investigation of pefloxacin-cation-DNA interactions: the essential role of Mg^{2+} . *International Journal of Pharmaceutics* 164, 57-65.
- Michiels, J., Xi, C., Verhaert, J., Vanderleyden, J., 2002 The function of Ca^{2+} in bacteria: a role for EF-hand proteins?. *Trends in Microbiology* 10, 87-93.
- Noble, C.G., Maxwell, A., 2002 The role of GyrB in the DNA Cleavage-religation reaction of DNA Gyrase: a proposed two metal-ion mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 318, 361-371.
- Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., Perin, R., 2003 Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 82, 281-288.
- Russell, I.D., 1992 Proper water medication with good water systems. *Poultry Digest* 12, 40-48.
- Sissia, C., Andreolli, M., Cecchetti, V., Fravolini, A., Gatto, B., Palumbo, M., 1998 Mg^{2+} Mediated binding of 6-substituted quinolones to DNA: relevance to biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 1555-1561.

Stanley, W.A. 2001 Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. *Avian Diseases* 45, 534-539.

Sumano, L.H., Gracia, M.I., Romero, V., 1984 Ruiz-Ramirez, L. The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Veterinary and Human Toxicology* 5, 476-477.

Sumano, L.H., Gutierrez, O.L. 2000 Bases farmacológicas del uso de la enrofloxacin en la avicultura en México. *Veterinaria Mexico* 31, 56-61.

Sumano L.H., Gutierrez O.L. 2002 Administration of capsaicin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations of enrofloxacin. *The Veterinary Record* 150, 350-353.

Sumano L.H., Gutierrez O.L. 2003 Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *The Veterinary Journal* 165, 143-148.

Sumano, L.H., Gutierrez, O. L., Aguilera, R., Rosiles, M. R., Bernard, B.M.J., Gracia, M. J. 2004 Influence of hard water on the bioavailability of enrofloxacin in broilers. *Poultry Science*. *Poultry Science* 83, 726-733.

Sumano L.H., Gutierrez O.L., Zamora Q.M.A. 2001 Bioequivalence of six trademarks of enrofloxacin in poultry. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 24, 1-5.

Sumano L.H., Ocampo, C.L., 1985 Compositional analysis surveillance of eleven trade of eleven trade brands of enrofloxacin including Baytril®, for veterinary use. *Journal Veterinary Medicine* 4, 54-59.

Wages, D.P. 1997 Proper medication procedures *Poultry Digest*. 56, 18-9.