

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CONTRIBUCIÓN A LA MODIFICACIÓN ESTRATÉGICA DE
LA FARMACOCINÉTICA EN LA ENROFLOXACINA
EN POLLO DE ENGORDA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
LILIA GUTIÉRREZ OLVERA

**T U T O R :
DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ**

**COMITÉ TUTORIAL:
DR. CARLOS LÓPEZ COELLO
DRA. MARIA JOSEFA BERNARD BERNARD**

2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre el Dr. Carlos Gutiérrez Martínez, por todo el amor, apoyo y cariño que siempre me dio.

A mi madre la Dra. Lilia Olvera de Gutiérrez por todo el amor y apoyo incondicional que me ha dado toda la vida.

A la memoria de mi abuelita Sabina Olvera Suarez, por tantos años de amor que me dio.

A mis hermanos Carlos, Areli y Eduardo Gutiérrez Olvera y a mi cuñada Rocio por quererme, apoyarme y comprenderme tanto.

Al Dr. Constancio Velázquez Coronel por todo el amor y paciencia que me ha tenido.

AGRADECIMIENTOS

A mis Tutores el Dr. Héctor Sumano López, la Dra. Maria Josefa Bernad Bernad y el Dr. Carlos López Coello, por la dedicación y apoyo que prestaron a mi investigación y por la gran ayuda que fueron para mi desarrollo académico durante el doctorado.

A mis compañeros y amigos Rita Aguilera y Agustín Nieto por su gran ayuda y apoyo que me han brindado siempre.

A la Señora Feliza Gonzales por la gran ayuda que me dio durante el desarrollo de la investigación.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el gran apoyo que otorga a las personas interesadas en la investigación.

Al Dr Luis Ocampo Camberos, jefe del departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, UNAM, por su apoyo brindado para mi realización del doctorado.

INDICE.

TEMA	página
RESUMEN	i
SUMARY	ii
1. Introducción	1.
2. Situación actual de la avicultura y problemática del uso de la enrofloxacin en México.	2.
3. Generalidades de enrofloxacin.	4.
3.1 Características fisicoquímicas de la enrofloxacin.	4.
3.2. Farmacocinética.	9.
3.3. Dosificación oral de la enrofloxacin.	11.
3.3.1 Generalidades de dosificación en aves.	11.
3.3.1.1 Generalidades del aparato digestivo de las aves.	13.
3.3.1.2 Estructuras anatómicas del sistema digestivo en aves .	15.
4. Resistencias bacterianas.	18.
5. Sistemas de influjo y eflujo en células procariotes y eucariotas.	21.
6. Bioequivalencias.	34.

7. ARTÍCULO : Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higer maximal serum concentrations.	36.
8. ARTÍCULO : Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higer maximal serum concentrations.	42.
9. ARTÍCULO : Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry.	46.
10. Discusión.	51.
11. Literatura citada.	57.

RESUMEN

La enrofloxacin es el antibacteriano más potente y utilizado en avicultura. Durante el establecimiento de las variables farmacocinéticas básicas para la enrofloxacin se hizo evidente la falta de bioequivalencias de los genéricos, con perfiles plasmáticos atípicos y valores de $C_{p_{max}}$ y AUC de tan solo el 30% o menos de lo obtenido para el producto original de referencia, a pesar de que las actividades *in vitro* no mostraban diferencias sustanciales (J Vet Pharmacol Therap 2001;24:309-313). En estas observaciones queda implícita la posibilidad de que los vehículos pudieran participar en el proceso de absorción de enrofloxacin a nivel gastrointestinal. En un intento por determinar si el proceso de absorción era o no saturable, se logró mejorar la absorción y los valores de $C_{p_{max}}$ (338 %) y AUC (347 %) al aumentar la concentración en el agua de bebida del 0.1 al 0.2% sin modificar la dosis final de 10 mg/kg (Vet J. 2003;165:143-148). Amén del valor clínico de este ensayo, se había determinado la capacidad gastrointestinal para absorber enrofloxacin mediante la modificación del preparado. Posteriormente y dadas las capacidades de la capsaicina de alterar las uniones estrechas entre células y facilitar la absorción de algunos fármacos, se consiguió un aumento de la absorción del 199.6 % en la AUC y de 155.02 para $C_{p_{max}}$ para enrofloxacin (Vet Rec 2002;16:350-353). Tomados en conjunto los datos mencionados, se puede sugerir que se ha contribuido a fomentar el uso óptimo de la enrofloxacin en aves, pero el análisis de la información lograda y generada, abre también la posibilidad de que se hagan manipulaciones adicionales a los vehículos para lograr literalmente nuevos medicamentos, sin haber modificado la estructura del principio activo

SUMMARY

In this study, during the establishment of the basic pharmacokinetic variables of enrofloxacin, it became clear the lack of bioequivalence of generic preparations as compared with the original/reference enrofloxacin preparation in spite of apparent similar *in vitro* activities (J Vet Pharmacol Therap. 2001;24:309-313). Plasma profiles of generic preparations rendered atypical concentration vs. time serum profiles having $C_{p_{max}}$ and AUC values as low as 30% of those obtained for the reference enrofloxacin. From these findings it became apparent that vehicles could modify absorption of enrofloxacin from the gastrointestinal tract. Then, an attempt to assess whether or not absorption was a saturated process was carried out by increasing the concentration of enrofloxacin in water from 0.1% to 0.2% but using the same dose of 10 mg/kg (Vet J. 2003;165:143-148). Plasma profiles $C_{p_{max}}$ and AUC (338 % and 346% respectively) were improved. Aside from the clinical value of this maneuver, enhancement of absorption of enrofloxacin from the GI tract became a possibility. Then, based on the ability of capsaicin to open cellular tight junctions and enhance absorption of some drugs, a controlled trial in broilers demonstrated an improved absorption of enrofloxacin of 64% with outstanding $C_{p_{max}}$ and AUC (155 and 199% respectively values (Vet Rec 2002;16:350-353). Taken these data together, it is possible to suggest that a contribution to the better use of enrofloxacin has been made; but also, analysis of the information gathered and generated opens the possibility of further manipulating the vehicles of enrofloxacin to obtain what should be viewed as a new drug, but without modification of the actual structure of the active principle.

CONTRIBUCIÓN A LA MODIFICACIÓN ESTRATÉGICA DE LA FARMACOCINÉTICA EN LA ENROFLOXACINA EN POLLO DE ENGORDA

1. INTRODUCCIÓN.

El inicio de la utilización de las quinolonas en medicina veterinaria data de la década de los 60's con la aparición del ácido nalidíxico, el cual fue utilizado primero en becerros y posteriormente en aves (1). Hasta mediados de la década de los 70's se introduce a la medicina veterinaria la primer fluoroquinolona, la flumequina (2). Aunque la flumequina fue un antimicrobiano muy utilizado en la industria avícola, el medicamento que revolucionó la terapéutica de enfermedades bacterianas en esta especie fue y aún es la enrofloxacin (3). Tanto en la década de los 80's como de los 90's se hace evidente el incremento en el uso de este agente antibacteriano. Las razones son su elevada potencia antibacteriana, quizá 50 ó 100 veces superior a la flumequina, que destruye las bacterias en cuestión de minutos y sus concentraciones óptimas bactericidas *in vitro* son tan solo 2 veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (4). Además, la enrofloxacin tiene amplio espectro y es capaz de actuar eficientemente contra los principales patógenos de las aves (*Mycoplasma* sp, *Haemophilus* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, entre otros.). Adicionalmente, a la fecha no se han identificado plásmidos que codifiquen resistencia contra este antimicrobiano, solo en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* transferidos de *Escherichia coli* bajo condiciones experimentales, no se les ha encontrado en bacterias Gram positivas (5, 6). Esto significa, que la generación de cepas resistentes se debe a la selección de mutantes resistentes por uso excesivo y mal uso de este agente (7).

Hace ya más de dos décadas que no se genera un grupo antibacteriano nuevo. Además, se estima, por parte de la industria farmacéutica, que para producir un antibacteriano novedoso y al menos tan potente como la enrofloxacin, se requiere una inversión cercana a los 100 millones de dólares y un periodo de investigación de 5 - 10 años. Evidentemente esto representa un capital de alto riesgo financiero (8). De tal suerte, es poco probable que en el corto o mediano plazo se genere un grupo de antibacterianos que iguale o supere la potencia de la enrofloxacin, utilizada ya por más de dos décadas en Latinoamérica.

Desafortunadamente, existen muchas facetas equívocas relacionadas con el uso de la enrofloxacin en Latinoamérica. Más adelante se detallan algunos de los principales factores que están haciendo que el antimicrobiano más potente utilizado en pollo de engorda a la fecha, pierda eficacia clínica. La dosificación de la enrofloxacin en aves puede mejorarse para optimizar su uso; así mismo es factible pensar que la modificación estratégica de la farmacocinética de la enrofloxacin en pollos pueda generar no solo un mejor uso de la enrofloxacin, lo cual conllevaría grandes ventajas, sino la existencia misma de un nuevo medicamento al tiempo que se obvia el gasto mencionado.

2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA AVICULTURA Y PROBLEMÁTICA DEL USO DE LA ENROFLOXACINA EN MÉXICO.

En la actualidad, las aves son criadas bajo condiciones intensivas, utilizando el mínimo espacio vital durante 5 a 7 semanas para alcanzar el máximo crecimiento y producción posible. En la mayoría de las explotaciones, casi cualquier problema infectocontagioso se disemina rápidamente y reduce el margen de ganancia, o bien, causa pérdidas económicas*. Evidentemente, la mortalidad, la morbilidad, la ganancia de peso e índice de conversión son las variables económicas y de salud más sensibles de estas explotaciones, de tal suerte, si se requiere evaluar la eficacia clínica de un antibacteriano en avicultura, se deben ponderar estas variables como parte esencial del análisis de eficacia y de costo:beneficio. A menudo el veterinario no contempla estos aspectos integralmente.

* <http://stirrup.home.texas.net>

Dada la velocidad de los eventos que se pueden suceder cuando se presenta una patología infectocontagiosa, a menudo no se medica en función de un diagnóstico preciso, sino como respuesta a una percepción empírica de que está por presentarse un brote de alguna enfermedad en la parvada. Como no es económicamente posible permitir que una parte de la parvada se desarrolle sin medicación y sirva de testigo no tratado, nunca llega a saberse en realidad si la intervención antibacteriana fue oportuna o tan sólo fue una percepción de que se evitó un problema mayor. En Europa se ha utilizado enrofloxacin en aves durante la primera semana de vida, reduciendo los problemas asociados a la inmunosupresión causada por vacunación o durante la tercera semana para combatir problemas respiratorios en los cuales se piensa se encuentran implicados los micoplasmas y la *Escherichia coli*^o. A este tipo de medicación se le denomina metafiláctica^o. Así, la combinación de la presión comercial por hacer de la avicultura un negocio cada vez más rentable y la amplia disponibilidad de la enrofloxacin han hecho que se utilice este recurso antibacteriano de manera excesiva^{**}, con posibles consecuencias negativas para la salud pública, dadas por la generación de cepas resistentes de microorganismos zoonóticos (*E. coli*, *Salmonella* sp y *Campylobacter* sp) que pueden ser resistentes a otras fluoroquinolonas análogas (ciprofloxacina, norfloxacina, etc.). En algunos países se ha ponderado el peligro de que la generación de cepas resistentes cause una epidemia de infecciones resistentes de consecuencias devastadoras para el hombre. En el mismo sentido, cabe mencionar que entre otras razones, este temor ha hecho que se considere incongruente utilizar a la enrofloxacin de manera “preventiva” mediante el uso de premezclas (9, 10, 11), práctica no prohibida en México y parte de Latinoamérica y estrictamente prohibida en Estados Unidos de América, Canadá y la Comunidad Europea^{***, †, *}. De hecho se ha documentado que para que las fluoroquinolonas y en este caso específicamente la enrofloxacin tenga una mayor eficacia, se les debe medicar en forma de bolo[‡]. Con esta maniobra se procura lograr una concentración plasmática máxima ($C_{p_{max}}$) en el menor tiempo posible (T_{max}) (1, 2).

^o <http://216.109.117.135/search/cache?p=enrofloxacin+enteric+pathogens++poultry+&ei=UTF-8&n=20&fl=0&u=www.dcmsonline.org/jax-medicine/2001journals/Feb2001/patterns.htm&w=enrofloxacin+enteric+pathogens+poultry&d=C3EB1DA088&c=483&yc=49752&icp=1>

^o Medicación aplicada al detectarse los primeros signos de enfermedad en una parvada.

^{**} (<http://980409.htm>) By Jill Lee April 9, 1998

^{***} <http://www.fda.gov/cvm>

[†] <http://antimicr.htm> Thursday, January 14, 1999

^{*} <http://www.octagon-services.co.uk/articles/prescribing.htm>.

[‡] Toda la dosis del día o del intervalo de dosificación en una sola toma o inyección.

3. GENERALIDADES DE ENROFLOXACINA

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA ENROFLOXACINA.

A todos los derivados del ácido 4-quinolínico, incluyendo el precursor inicial, el ácido nalidíxico (Figura 1), se les ha dividido en Latinoamérica y España por cuestiones de espectro, características químicas y comercialización en tres generaciones. La enrofloxacin pertenece a la tercera.

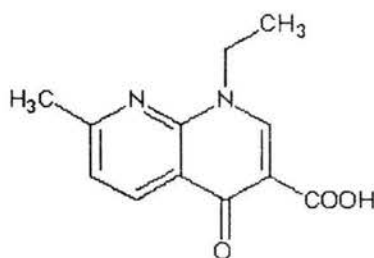


Figura 1. Fórmula estructural del ácido nalidíxico

El flúor en la posición 6, un radical 4-etil-piperazinil-1-il en la posición 7 y un ciclopropilo en la posición 1 distinguen a las quinolonas de tercera generación. En particular la sustitución en la posición 7 les da la propiedad de lograr el doble de la concentración plasmática en comparación con los agentes de segunda generación (12, 13, 14, 15). Esta generación es la de mayor éxito comercial y terapéutico en medicina veterinaria en particular, la enrofloxacin (1 - 3, - ciclo - propil - 6 - fluor - 1, - dihidro - 4oxo - 7 (4-etil-1-piperazinil) 3 - quionolona - ácido - carboxílico) (Figura 2), desarrollada exclusivamente para uso en medicina veterinaria a partir de la ciprofloxacina[†]. Entre sus características más importantes destacan el hecho de que actúa de manera dependiente de la concentración, ejerciendo un rápido efecto bactericida contra Gram negativas aerobias y micoplasmas, incluyendo algunas que son resistentes a otros antibacterianos y a quinolonas y fluoroquinolonas de primera y segunda generación (16, 17, 18, 19, 20).

[†] Fármaco de uso exclusivo en humanos , excepto en México

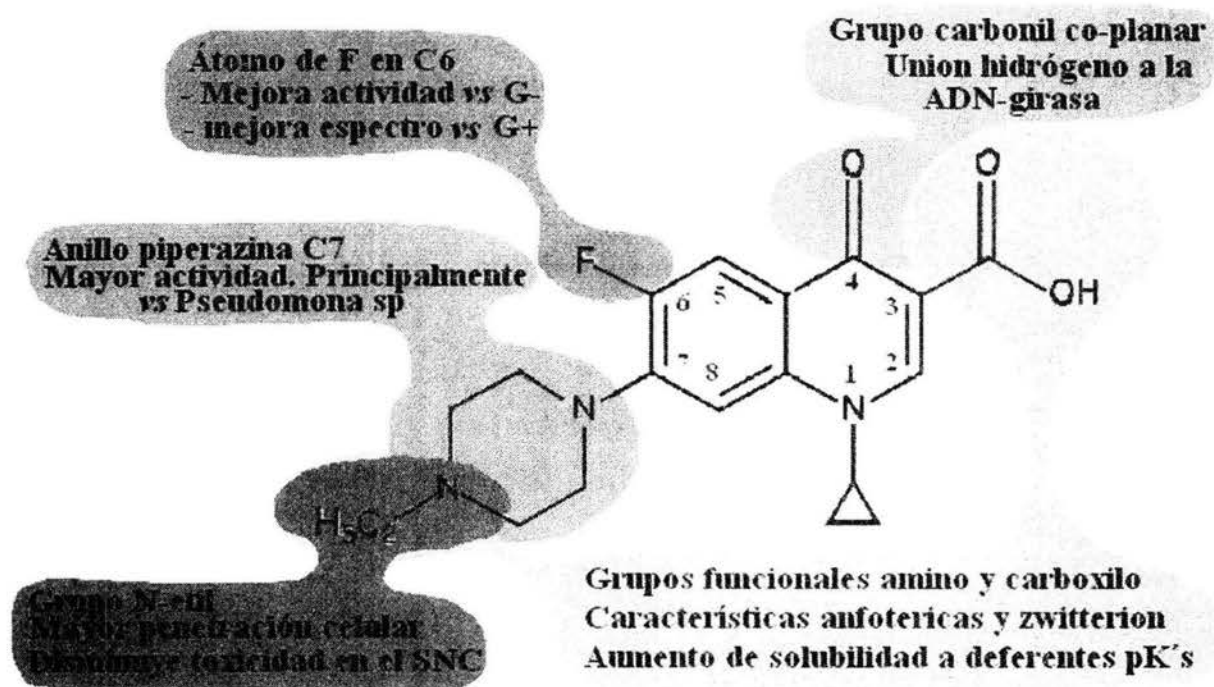


Figura 2. Fórmula estructural y grupos reactivos de la enrofloxacin

Las constantes de disociación definen los grados de ionización de las quinolonas a diferentes pH's, lo cual es importante para definir la capacidad de absorción del tracto gastrointestinal (TGI) o cualquier membrana para la enrofloxacin. Se ha establecido que para cualquier quinolona y fluoroquinolona el pKa esta dado con base en el grupo carboxílico, siendo de 6.0 ± 0.3 , independientemente de la substitución en la posición 7. En el caso de la enrofloxacin el pKa para el grupo carboxilo en la posición 3 es de 5.94 ± 0.09 y para el grupo piperazinil en la posición 7 es de 8.70 ± 0.44 (20).

La enrofloxacin puede encontrarse en 4 formas: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico, todos ellos dependiendo del pH al que se encuentren (Cuadro 1). A pH's bajos tanto el grupo piperazinil como el carboxílico se encuentran protonados y a pH's altos ninguno de ellos se encuentra protonado (Figura 3). En solución, las especies catiónicas y aniónicas se acercan a la concentración total de enrofloxacin en pH's altos o bajos, respectivamente, y las especies neutras logran su máximo en pH's isoelectricos, así, la mayor fracción de disociación corresponde al ácido carboxílico, después el amino y la menor proporción por las especies neutras (Figura 4). La máxima solubilidad para la

enrofloxacin se logra a un pH de 5.02 y el mayor porcentaje de transferencia de fase acuosa a fase orgánica se encuentra a un pH de 7.00 (20). Cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso de enrofloxacin a las bacterias en forma de zwitterion a través de canales de porinas hidrofílicas, mientras que al encontrarse en pH's ácidos se encuentra en forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión ni por los canales de porinas.

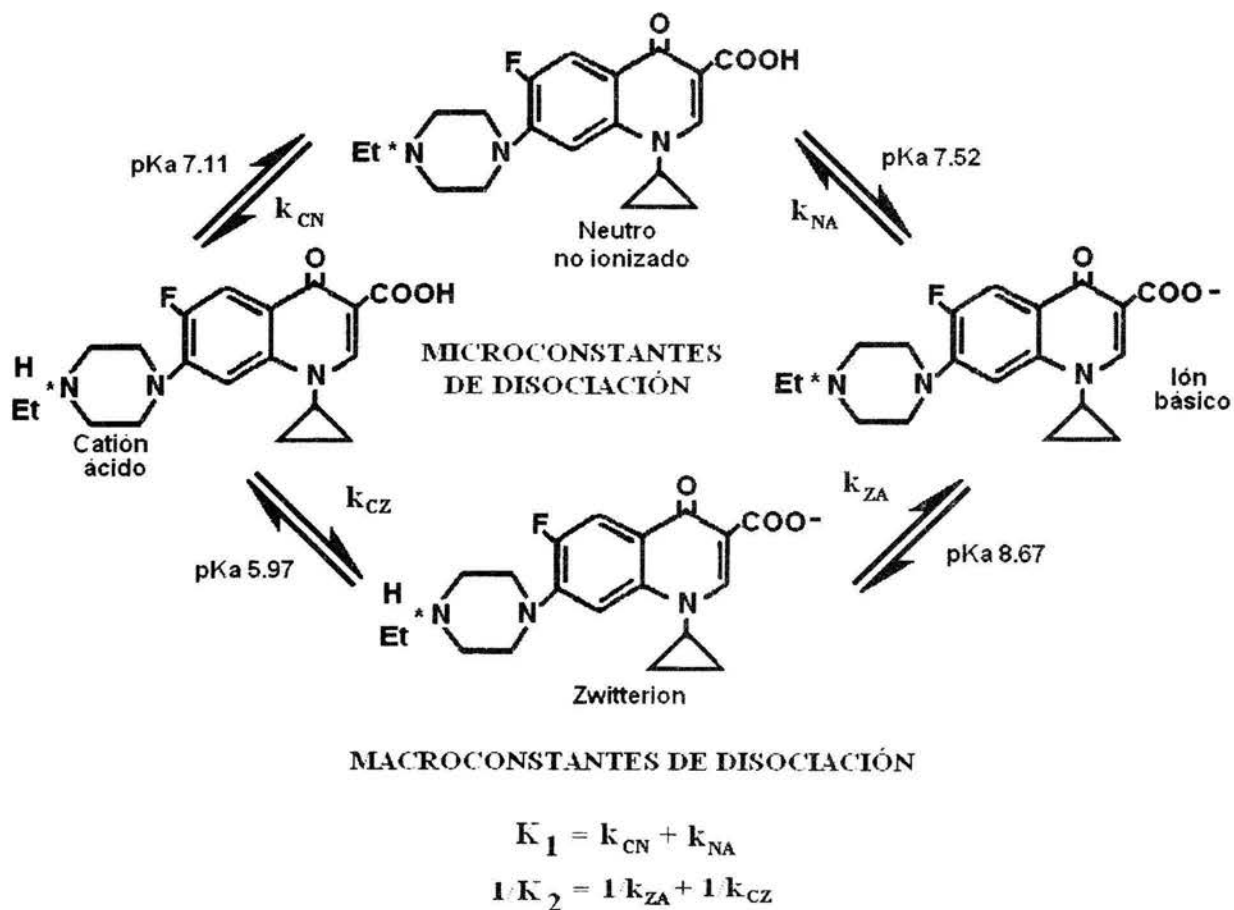


Figura 3. Microconstantes y macroconstantes de disociación de la enrofloxacin

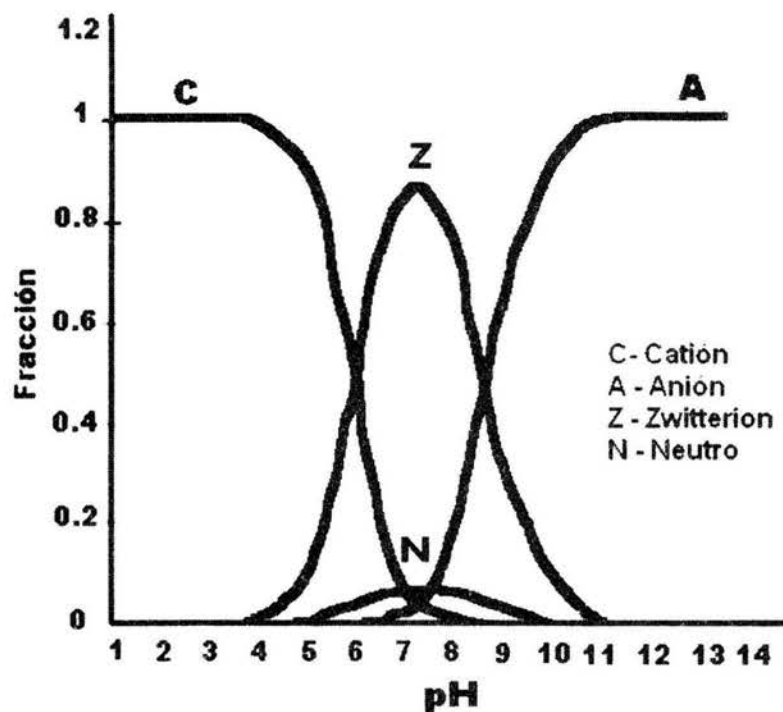


Figura 4. Distribución de las 4 formas en las cuales se puede encontrar la enrofloxacin en función del pH.

Cuadro 1. Valores de pK asociados con las microconstantes, macroconstantes y las fracciones de enrofloxacin asociada en un pH isoelectrico

<i>Microconstantes, macroconstantes y fracciones de enrofloxacin</i>	<i>pK</i>
pK ₁	5.94
pK ₂	8.70
pI = (pK ₁ + pK ₂)/2	7.32
pK _{CN}	7.11
pK _{CZ}	5.97
pK _{NA}	7.52
pK _{ZA}	8.67
[C]	0.0385
[A]	0.0385
[N]	0.9231
[N]	0.0620
[Z]	0.8611
[Z] / [Z]	13.86

En general, las quinolonas y en especial las de tercera generación se inactivan poco en presencia de suero y otros fluidos orgánicos, actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular. Las fluorquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas[⊗] (15, 22, 20).

Al igual que las demás fluoroquinolonas, la enrofloxacin actúa directamente sobre enzimas implicadas en la replicación del ADN (Topoisomerasa IV y ADN girasa). Se forma un complejo que provoca una ruptura irreparable en el ADN de lo cual se deriva su gran poder bactericida (6, 13, 16, 20), a diferencia de las quinolonas no fluoradas actúa tanto en la subunidad A como en la B de la topoisomerasa II. Esta característica le confiere una actividad a la cual las bacterias tienen menos mecanismos de resistencia (12, 15).

Tanto la topoisomerasa IV como la ADN girasa, son enzimas esenciales en la replicación bacteriana, la ADN girasa actuando en los desenrollamientos y la topoisomerasa sobre la separación de la doble hélice; ambas enzimas se encuentran compuestas por dos subunidades, para la ADN girasa son la GyrA y la GyrB, y en la topoisomerasa IV son ParC y ParE. GyrA y ParC presentan una estructura similar, aplicándose lo mismo para GyrB y ParE. El mecanismo general por medio del cual actúan esta dado por la interferencia a nivel de las dos cadenas de ADN de doble hélice que deben separarse para permitir la replicación o transcripción. Al iniciar la división celular, la enzima bacteriana ADN-girasa o topoisomerasa II induce superdesenrollamientos negativos en el ADN, ésta es una reacción ATP dependiente que logra la separación de ambas cadenas de ADN para permitir el pasaje de un segmento de ADN a través de la fractura, el cual es posteriormente liberado. La inhibición de este proceso por las fluoroquinolonas bloquea múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales para la bacteria. En resumen, la enrofloxacin actúan a dos niveles de la ADN-girasa y se considera que destruye a la bacteria por un efecto combinado de inhibición metabólica más destrucción del material genético y aún de la misma ADN-girasa. (6, 12, 13, 16, 23).

[⊗] The Lancet. Infectious Diseases June 2003. <http://infection.thelancet.com>

3.2. FARMACOCINÉTICA DE LA ENROFLOXACINA EN AVES

La enrofloxacin tiene una biodisponibilidad cercana al 60% por vía oral y una buena penetración a tejidos (24-28). Los estudios farmacocinéticos han demostrado que las concentraciones de enrofloxacin en el suero y en los tejidos se encuentran arriba de los CMI de la mayoría de los microorganismos Gram negativos, validando así su eficacia (15, 25, 26).

La enrofloxacin es parcialmente metabolizada en el hígado en otros metabolitos entre los que destaca la ciprofloxacina, fluoroquinolona utilizada ampliamente en humanos. La excreción renal es la mayor ruta de eliminación de la enrofloxacin y sus metabolitos, tanto por filtración como por excreción tubular (25). Se podría mencionar que la ciprofloxacina es su principal metabolito activo, y algunos de sus metabolitos inactivos o con baja actividad son: I) congéneres de enrofloxacin 3-, 6-, y 8-hidroxiato, los cuales poseen una nula o muy baja actividad antibacteriana; II) congéneres 5, 6- (ó 6, 8-), 5, 8-, y 7, 8 - dihidroxiato, los cuales sufren una transformación autoxidativa; III) compuestos tipo-isatin, así como los derivados del ácido antranílico, que tiene directamente una hendidura del anillo heterocíclico de la enrofloxacin; y IV) 1-etilpiperazin, el congéneres amino-7, y desetilen-enrofloxacin, que representan tanto la molécula de degradación como de eliminación del segmento piperazinil (29).

La evaluación de la farmacocinética de enrofloxacin, después de inyección intravenosa de 10 mg/kg se ajusta idealmente a un modelo de dos compartimientos, en el que primero se distribuye en órganos perfundidos y sangre (fase de distribución rápida) y posteriormente se distribuye a tejidos. Sus volúmenes aparentes de distribución son elevados (V_{dss} = volumen de distribución en el estado estable, 2.43 l/kg y V_{dAUC} = volumen de distribución área, 2.7 l/kg), lo que indica una eficiente distribución de enrofloxacin fuera del plasma (25, 26). La vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) observada en aves fluctúa entre 4.05 h (25) y 10 horas (26), lo que garantiza concentraciones tisulares importantes, al menos por 24 horas. Los valores tan prolongados de la $T_{1/2\beta}$ en aves se atribuyen al bajo grado de filtración glomerular en esta especie con respecto a la de los mamíferos (25). El porcentaje de transferencia de enrofloxacin del compartimento central al periférico ocurre, aparentemente,

de manera tan rápida como en dirección inversa (K_{12} y K_{21}), lo que confirma su elevada capacidad de difusión y liposolubilidad. (26, 30). Los datos cinéticos documentados en la bibliografía se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores farmacocinéticas de enrofloxacin en aves a diferentes dosis por vía oral por varios autores

VARIABLE	<i>Bugey et al</i> (31)	<i>Abd-el Aziz et al</i> (16)	<i>García Ovando et al.</i> (26)			<i>Anadón et al</i> (19)	<i>Kietzmann et al.</i> (27)
Dosis (mg/kg)	10	10	2.5	5	10	10	10
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	12.23 \pm 3.68	16.60 \pm 0.55	*	*	*	*	14.42
$V_{d_{\text{Area}}}$ (L/kg)	*	*	*	*	*	5.94 \pm 0.20	5.81
$V_{d_{\text{ss}}}$ (L/kg)	*	*	*	*	*	4.41 \pm 0.16	*
α (hr^{-1})	*	*	*	*	*	0.50 \pm 0.03	*
β (hr^{-1})	*	0.016 \pm .003	*	*	*	0.049 \pm .002	*
A ($\mu\text{g/ml}$)	*	2.30 \pm 0.17	*	*	*	*	*
B ($\mu\text{g/ml}$)	*	2.48 \pm 0.12	*	*	*	*	*
$T_{1/2} \alpha$ (hr)	0.44 \pm 0.11 1.17 \pm 0.40	*	*	*	*	1.43 \pm 0.10	*
$T_{1/2} \beta$ (hr)	9.24 \pm 2.07	4.29 \pm 0.097	2 – 3.5	0.4	0.4	14.23 \pm 0.46	1.20
$T_{1/2} \text{ abs}$ (hr)	*	0.92 \pm 0.049	*	*	*	*	5.81
Cl_{tot} (ml/min/kg)	*	0.36 \pm 0.01	*	*	*	*	*
$C_{p_{\text{max}}}$ ($\mu\text{g/ml}$)	1.34 \pm 0.44	1.69 \pm 0.082	0.5	0.6	1.4	2.44 \pm 0.06	1.88
T_{max} (hr)	1.50 \pm 0.29	2.52 \pm .075	*	*	*	1.64 \pm 0.04	1.5
F (%)	62.26	59.58 \pm 4.16	*	*	*	64 \pm 0.29	89.2

α = constante híbrida de la fase de distribución; β = constante híbrida de la fase de eliminación $T_{1/2} \alpha$ = vida media de distribución $T_{1/2} \beta$ = Vida media de la fase de eliminación; $T_{1/2} \text{ abs}$ = Vida media de absorción; $V_{d_{\text{Area}}}$ = volumen de distribución aparente. $V_{d_{\text{ss}}}$ = volumen de distribución en el estado estable; AUC = área bajo la curva concentración/tiempos Cl = depuración; $C_{p_{\text{max}}}$ = concentración plasmática máxima; T_{max} = Tiempo al que se alcanza la $C_{p_{\text{max}}}$ F = biodisponibilidad.

La velocidad de absorción de la enrofloxacin es más completa después de la aplicación subcutánea (SC) o intramuscular (IM) en comparación con la oral (PO) ($T_{1/2} \text{ abs IM} = 0.37$ h; $T_{1/2} \text{ abs SC}$, 0.36 h y $T_{1/2} \text{ abs PO}$, 0.92 h). Se calculan los porcentajes de biodisponibilidad en: IM = 87.51%; SC = 80.78% y PO = 59.58% (25).

La rápida absorción y biodisponibilidad razonablemente buena de la enrofloxacin por vía oral le confiere una notable ventaja en casos de infecciones bacterianas severas, durante las cuales, las aves disminuyen drásticamente su consumo de agua. Sin embargo, sería deseable generar preparados que mejoren su biodisponibilidad. En el hígado se alcanzan las concentraciones máximas de enrofloxacin, seguido de pulmón y riñón y la más baja en cerebro. La enrofloxacin desaparece completamente de todo el tejido después de 3 días (25).

No obstante, debe considerarse que cada preparado comercial debe determinar su tiempo de retiro, en virtud de que los vehículos pueden modificar sustancialmente las tasas de absorción y con ello el tiempo de depuración (12).

Dado que la $C_{p_{max}}$ lograda con la aplicación intramuscular es superior a la oral, se ha recurrido a la modalidad de la aplicación por esta vía al recibir el pollo en la caseta, con lo que se hace óptima la eficacia del fármaco (25, 32 -34). Sin embargo, el manejo es caro, y no dejan de ocurrir accidentes en la manipulación tanto para los pollos como para los operarios.

3.3. DOSIFICACIÓN ORAL DE LA ENROFLOXACINA

3.3.1 Generalidades de dosificación en aves

Cuando se diagnostica un problema bacteriano agudo, se medica la parvada por vía oral mediante el agua de bebida*. La medicación antibacteriana en general en aves comerciales tanto para efectos profilácticos, como terapéuticos, por medio del agua de bebida, ofrece grandes ventajas y pocas desventajas. Dentro de sus ventajas se puede mencionar: bajos costos, facilidad de aplicación, poco manejo, efecto terapéutico inmediato, facilidad de cambio de fármaco o de dosis, además un ave enferma generalmente deja de comer, pero no de tomar agua. Como desventajas se considera el hecho de que hay una gran variabilidad de consumo de agua entre animales, uso poco profesional o inadecuado de los medicamentos asociados a problemas de solubilidad, estabilidad, limpieza de tuberías, dosis mal calculadas, interacciones indeseables entre otras. El agua de buena calidad es un insumo esencial para el éxito de una explotación y evidentemente, para la dosificación precisa de antibacterianos a una parvada. Particularmente para la enrofloxacin, la pureza del agua es clave ya que la presencia excesiva de iones abaten su potencia (5, 7, 9, 35, 36). No debe olvidarse que los sistemas de bebederos y tuberías deben estar limpios, protegidos de la luz y el calor ambiental. Aunque la enrofloxacin es estable hasta aproximadamente los 50 °C, es fotosensible y si existe una carga bacteriana importante en el sistema de abastecimiento de agua su eficacia disminuirá proporcionalmente (15, 35, 37, 38). En la actualidad se prefieren instalaciones plásticas o de PVC dado que la

* <http://avian1.html> dawhite@prairie.nodak.edu

acumulación de minerales y las instalaciones galvanizadas disminuyen también la biodisponibilidad de varios antibacterianos, entre ellos muy probablemente la enrofloxacin (39 – 42). Idealmente se deben medicar las aves con dosificadores automáticos cercanos al bebedero, pero esta situación no es común en explotaciones en Latinoamérica; lo más común es la medicación en el tinaco. En este caso, se recomienda utilizar un medidor de flujo, de los cuales existen diversos modelos en el mercado. Con ello, se puede realizar el cálculo necesario para medicar a la parvada en función de su consumo de agua y no de manera simplificada, añadiendo la enrofloxacin en por ciento o en partes por millón (ppm) al tinaco (39, 41).

Se ha documentado que cuando se mantiene a la parvada 1°C por arriba de la banda de comodidad térmica, las aves consumirán un 9% más de agua y lo contrario ocurrirá si se medican en un clima 1°C más frío que la temperatura mencionada como ideal (15, 35, 37, 38). Se sabe que muchos antibacterianos impiden una respuesta inmune adecuada y más aún si se sobredosifican (43-45). Aunque en teoría la sobremedicación con enrofloxacin no genera toxicidad, sí genera pérdidas económicas. Al parecer la enrofloxacin no altera las funciones fagocíticas, incluso las estimula a dosis terapéuticas (46, 47), pero aún no se ha detallado su papel en la integridad de la respuesta inmune de pollos sobremedicados (39, 42). En contraste, un bajo consumo de agua que genere subdosificación puede dar lugar a una pobre eficacia clínica y quizá la aparición de cepas resistentes (36).

A pesar de estos datos rara vez se piensa que en la parvada, una falla en la eficacia clínica de la enrofloxacin se deba a problemas en la dosificación. Por lo general, se considera como falta de eficacia clínica por “resistencia bacteriana”*. Dados los argumentos presentados y la forma en que se maneja la enrofloxacin en campo, es factible que se haya sobreestimado la mencionada “resistencia bacteriana” en muchos casos (48-50).

Para que una terapia antibacteriana resulte eficaz, se requiere que el clínico sea capaz de situar al fármaco dentro de un nivel denominado “ventana terapéutica”. Esto es, en general, que la dosis administrada brinde concentraciones plasmáticas que se mantengan al menos al

* 38th ICAAC contact Jim Sliwa

doble de la concentración mínima inhibitoria del patógeno sospechoso (51). En lo que respecta a las quinolonas se ha encontrado que los principales parámetros que influyen en la eficacia de su acción antimicrobiana son: pico máximo de concentración (10 a 12 veces la CMI) y el área bajo la curva concentración/tiempo (AUC 24 hrs/ CMI >125) (24). En México se presenta la necesidad de ponderar si la presentación farmacéutica tiene la calidad necesaria. Para la enrofloxacin, se ha demostrado una enorme variación en los componentes de las presentaciones farmacéuticas, incluso añadiendo moléculas afines como ciprofloxacina en lugar de enrofloxacin (52, 53). Pero más grave aún puede ser el hecho de no saber si se cuenta con diversas calidades de la enrofloxacin *per se*. A la fecha, se encuentran disponibles enrofloxacin y sales de enrofloxacin de origen chino, hindú, español, alemán, brasileño, y no sería extraordinario que tuvieran potencias notablemente distintas. Por otro lado, no se ha demostrado si las diferencias químicas impactan en el comportamiento farmacocinético. Existen evidencias circunstanciales de la ausencia de bioequivalencias entre distintos preparados de enrofloxacin a través de la percepción clínica. Más aún, existen en México preparados con enrofloxacin y trimetoprim, comercialmente disponibles, a pesar de que los resultados indican que sus efectos son antagónicos (54). Con este panorama la confiabilidad o reproducibilidad de respuestas clínicas al antibacteriano más potente, destinado para medicina veterinaria, será entonces muy baja.

3.3.1.1 GENERALIDADES DEL APARATO DIGESTIVO DE LAS AVES

Si se quiere generar una modificación estratégica de la farmacocinética de la enrofloxacin, además de lo mencionado, es necesario puntualizar las peculiaridades del TGI de las aves.

Existen diferencias importantes entre el tubo digestivo de las aves y el de los mamíferos; por ejemplo: el proventrículo tiene un tiempo de vaciamiento muy impredecible, tiene poca capacidad y tiene un pH relativamente elevado (Cuadro 3). La excitación, miedo, estrés, disminuyen la motilidad del proventrículo y del TGI en general, alterando los patrones de absorción de medicamentos (55).

Cuadro 3. pH de los diversos segmentos del tracto digestivo y tiempos de estancia del alimento en cada uno de ellos (55)

Segmento del TGI	pH	Tiempo de estancia (minutos)
Ingluvie	5.5	31 - 41
Estómago glandular	2.5 - 3.5	39 - 33
Estómago muscular	2.5 - 3.5	
Duodeno	5 - 6	5 - 10
Yeyuno	6.5 - 7	71 - 84
Ileon	7 - 7.5	90 - 97
Ciego	6.9	115 - 120
Recto	6.3	26 - 56
Cloaca	7 - 8	-

Evidentemente en el TGI de las aves están ausentes los dientes, está presente un inglúvie bien desarrollado y una molleja, el ciego es doble y falta el colon. Tales diferencias anatómicas se traducen en diferencias en los procesos digestivos y los pH's con respecto a lo observado en mamíferos (Figura 5).

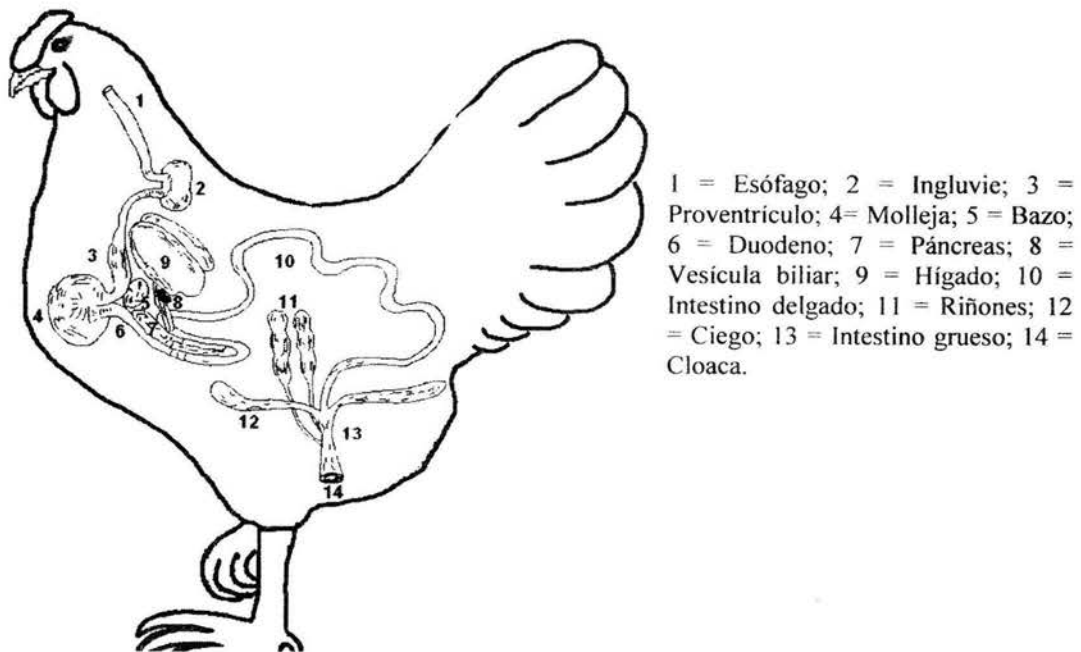


Figura 5. Estructuras anatómicas del tracto gastrintestinal de las aves

3.3.1.2 ESTRUCTURAS ANATÓMICAS DEL SISTEMA DIGESTIVO EN AVES

El pico es el representante de las mandíbulas, de los labios y en parte de los carrillo, posee un fundamento óseo revestido por una vaina córnea de dureza variable. La valva superior del pico se compone de la raíz o base, el lomo (dorso del pico) y el borde. La valva inferior consta de una parte media impar (*gonium*), de la cual salen las ramas que comprenden el ángulo maxilar, el pico está provisto de numerosas terminaciones sensitivas del trigémino, que lo convierten en un órgano táctil, encontrándose la mayoría en la punta del pico. Este sitio se constituye entonces en la principal estructura prensil, permaneciendo el alimento por solo un instante.

No existe una separación real entre la boca y la faringe, en las paredes de la cavidad bucal se hallan numerosas glándulas salivares, la cantidad de saliva segregada por una gallina adulta en ayunas en 24 horas varía de 7 a 25 ml, dependiendo del consumo de agua y de la temperatura ambiental, con un pH promedio de 6.75. La saliva es principalmente agua, sialoproteínas y en mayor porcentaje contiene amilasas y pequeñas cantidades de lipasa.

La lengua es poco móvil, se encuentra suspendida del hioides, formando con él un conjunto. Los músculos linguales propiamente dichos, que constituyen la base del órgano de referencia, son rudimentarios, de ahí que su movilidad sea escasa. Se encuentra revestida por una mucosa tegumentaria cornificada principalmente la punta y en el dorso en donde existe una fila transversal de papilas filiformes o cónicas dirigidas hacia atrás. La mucosa lingual posee corpúsculos nerviosos terminales, que sirven para la percepción táctil. Su actividad funcional es la de prensión, selección y deglución de los alimentos.

El esófago se encuentra situado a lo largo de la parte inferior del cuello, sobre la tráquea, dirigiéndose hacia el lado derecho en el tercio superior de éste para situarse en tercio inferior en la cara anterior derecha del cuello donde se encuentra cubierto solamente por piel, hasta su entrada en la cavidad torácica. Es amplio y dilatado, sirviendo así para acomodar los voluminosos alimentos sin masticar. De allí se encuentra una evaginación extraordinariamente

dilatable, dirigida cranealmente y a la derecha, que es el ingluvie al que se llama comúnmente buche, el cual es un ensanchamiento estructural, que cumple con dos funciones: almacenamiento de alimento para el remojo, humectación y maceración de los alimentos y regulación de la repleción gástrica.

El estómago está formado por dos porciones o cavidades, claramente distinguibles exteriormente, que son el estómago glandular y el estómago muscular. Al estómago glandular también se le denomina proventrículo o ventrículo sucenturiado. Está situado a la izquierda del plano medio, en posición craneal con respecto al estómago muscular. Se estrecha ligeramente antes de su desembocadura en el estómago muscular, constituye en gran manera un conducto de tránsito para los alimentos que proceden del ingluvie y que se dirigen hacia la molleja. Está recubierto externamente por el peritoneo, formado por una túnica muscular, compuesta de una capa externa, muy fina, de fibras longitudinales y de otra interna, de fibras circulares. Su mucosa contiene glándulas bien desarrolladas que segregan ácido clorhídrico (HCl) y pepsina (Cuadro 4). Al igual que en los mamíferos el TGI de las aves está innervado por el sistema nervioso parasimpático.

Cuadro 4.-Principales enzimas que actúan en el aparato digestivo de las aves (55)

FUENTE	ENZIMA	SUBSTRATO	PRODUCTO FINAL
Glándulas Salivales	Amilasa (ptialina)	Almidón	Maltosa
Proventrículo	Pepsina HCl	Proteínas Activa proteinasas	Polipéptidos
Jugo intestinal	Amilasa Tripsina	Polisacáridos Polipéptidos	Poli-disacáridos Péptidos
Jugo pancreático	Amilasa Tripsina Lipasa	Poli-disacáridos Polipéptidos Grasa coloidal	Di-monosacáridos Amino ácidos Acidos grasos y glicéridos
Hígado	Sales biliares	Masa de grasa	Grasa coloidal

El estómago muscular o molleja, se adhiere a la porción caudal del proventrículo. Ocupa la mayor parte de la mitad izquierda de la cavidad abdominal, está cubierto en su

extremo anterior por los dos lóbulos hepáticos y tiene un pH promedio de 4.6, no se segregan jugos digestivos aquí. Su pared está constituida por una capa córnea y una túnica muscular. La parte de la pared gástrica desprovista de aponeurosis está ocupada por dos músculos intermedios. Esta recubierta interiormente de una mucosa de abundantes pliegues en ellos hay glándulas que asemejan a las glándulas pilóricas de los mamíferos, sobre esta mucosa se extiende una capa córnea formada por el endurecimiento de la secreción de las glándulas del epitelio. La túnica muscular está formada por dos parejas de músculos que rodean a la cavidad gástrica. Su actividad motora es de carácter rítmico, de modo que aparece una contracción de los dos músculos principales asimétricos que se presionan mutuamente, así el estómago disminuye su longitud en el sentido de su eje mayor, de modo que los alimentos situados entre ambos músculos resultan fuertemente comprimidos. Estos movimientos están controlados por la inervación vagal.

El intestino delgado se extiende desde la molleja al origen de los ciegos, es comparativamente largo a las estructuras descritas y de tamaño casi uniforme. Se subdivide en: duodeno que sale del estómago muscular por su parte anterior derecha, se dirige caudalmente y hacia abajo a lo largo de la pared abdominal derecha, en el extremo de la cavidad dobla hacia el lado izquierdo, se sitúa encima del primer tramo duodenal y se dirige hacia delante y arriba. De este modo se forma un asa intestinal, la llamada asa duodenal, en forma de "U", cuyas dos ramas están unidas por restos de mesenterio. Entre ambos tramos de dicha asa se encuentra el páncreas. La reacción del contenido del duodeno presenta un pH de 6.31, por lo que posiblemente las enzimas del jugo gástrico ejercen aquí la mayor parte de su acción. El yeyuno empieza donde una de las ramas de la U del duodeno se aparta de la otra, consta de unas diez asas pequeñas, dispuestas en forma de guirnalda y suspendidas del mesenterio. Tiene este tramo un pH de 7.04. El ileon es una estructura estirada que se encuentra en el centro de la cavidad abdominal. Tiene un pH de aproximadamente 7.59.

Intestino grueso: que se subdivide en tres porciones: El ciego, que posee dos partes o dos ciegos. Son tubos con extremidades cerradas, que se originan en la unión del intestino delgado y el recto y se extienden cranealmente hacia el hígado. El pH del ciego derecho es de 7,08, mientras que el pH del ciego izquierdo es de 7,12. La porción terminal de los ciegos es

mucho más ancha que la porción inicial, su función es de absorción. El colon y el recto son sitio en los que se realiza la absorción de agua y las proteínas. Tienen un pH promedio de 7.38. Se considera que las dos últimas porciones del intestino grueso constituyen el recto (55).

4. RESISTENCIAS BACTERIANAS

El desarrollo de resistencias bacterianas a los antibacterianos es uno de los casos más documentados de evolución biológica. El gran consumo (más de 1 tonelada por día en algunos países europeos, 10500 toneladas de ingrediente activo al 100% de pureza en Estados Unidos de Norte America en un año[‡]) de antibacterianos tanto en animales como en humanos, se ha propuesto como la principal causa del surgimiento y propagación de una gran serie de resistencias bacterianas, siendo a la fecha un gran problema tanto en salud pública como en la clínica pecuaria.

Los cortos tiempos generacionales y las grandes poblaciones de procariotas en las cuales continuamente están surgiendo variantes por mutaciones y/o recombinaciones de ADN, además del paso de información genética de forma horizontal y vertical ya sea de ADN homólogo o no homólogo, son ciertamente los principales mecanismos de la gran diversidad de resistencias que se han ido generando con el paso de los años. El desarrollo de resistencias bacterianas es una de las evoluciones biológicas mejor documentadas en la actualidad (56). Como panorama general se menciona que los principales mecanismos por los cuales se desarrollan resistencias a las quinolonas y fluoroquinolonas son:

- a) Alteración en las enzimas blanco: para que las fluoroquinolonas actúen se tienen que unir a enzimas específicas encargadas de provocar el desenrollamiento del ADN (GyrA - ParC y GyrB - ParE), al cambiar alguno de los aminoácidos que conforman a dichas enzimas disminuye al actividad de la fluoroquinolona
- b) Existen diferentes potencias en unión y especificidad a la ADN girasa y Topoisomerasa IV, se ha encontrado que la ADN girasa es el principal sitio de acción en bacterias Gram negativas y la Topoisomerasa IV para las Gram positivas; lo cual conlleva a tener

[‡] <http://www.agbioforum.org>.

diversos grados de resistencias, si la mutación en una bacteria G⁺ se da en la ADN girasa generalmente se observa solamente una pequeña variación en las CMI's, pero si la mutación se da en la Topoisomerasa IV la resistencia será mayor.

- c) Por alteraciones en el acceso a las fluoroquinolonas a sus sitios blanco. La enrofloxacina posee la propiedad de introducirse a las bacterias por medio de canales de porinas, lo cual le da la capacidad de atravesar la membrana por difusión, la resistencia a fluoroquinolonas en bacterias gram negativas se asocia a la reducción de porinas, con lo cual se reduce la acumulación de enrofloxacina dentro de la bacteria, sin embargo mediciones realizadas a los rangos de difusión sugieren que no son lo suficientemente grandes como para producir resistencia. Recientemente se ha visto que un aumento en la expresión de sistemas de eflujo[§] mediante bombas especializadas ubicadas principalmente en la membrana y con alcance desde el citoplasma. Se menciona que los complejos de eflujo se encuentran conformados por tres proteínas, una bomba intramembranal, un canal extramembranal y una proteína de fusión periplásmica. La energía necesaria en este proceso deriva del gradiente de protones a través de la membrana. Por otro lado se sabe que la difusión esta restringida a pH's determinados y la diferencia de pH entre el medio y el citoplasma puede afectar la acumulación de la enrofloxacina en la célula, esta característica contribuye a la reducción de la potencia de las fluoroquinolonas en la presencia de un pH bajo. Todas las bacterias poseen proteínas insertas en la membrana citoplasmática, las cuales poseen funciones fisiológicas importantes, entre ellas el transporte de sustancias dentro o fuera de la célula, las bombas de eflujo pueden mover sustancias del citoplasma y se les ha encontrado en todas las bacterias estudiadas, siendo su principal función la remoción de sustancias tóxicas de la célula y de su membrana, cada bacteria posee una serie de bombas de eflujo, que obtienen energía por los gradientes de protones a través de la membrana o por hidrólisis de ATP. Estas bombas pueden sacar determinado antibiótico de la bacteria y algunas denominadas como bombas de resistencias multifármacos (MDR, *multidrug resistance pumps*) pueden sacar varios antibióticos. Sin embargo, las fluoroquinolonas no participan directamente en el proceso de

[§] anglicismo derivado de "efflux", término que se refiere a la propiedad de las bacterias de expulsar activamente una sustancia desde el citosol al exterior

selección evolutiva de las MDR quizá por ser compuestos sintéticos, por lo que se les ha considerado como sustratos no específicos para las bombas (6, 57- 62).

Los principales motores de los mecanismos de resistencia son las subdosificaciones y en veterinaria se recurre a menudo al denominado efecto postantibiótico** para justificar dosis a intervalos demasiado prolongados (6).

En particular para las fluoroquinolonas el desarrollo de resistencias bacterianas puede estar dado por alteraciones espontáneas poco frecuentes en genes ya existentes (mutación) principalmente por errores de la polimerasa durante la replicación del DNA. Se considera que esto se da aproximadamente en una de cada millón de bacterias y dentro de estas son pocas las que son específicas de resistencia a fluoroquinolonas. Particularmente se sabe que la resistencia a las quinolonas es más rápida que a las fluoroquinolonas. De manera natural la resistencia a las fluoroquinolonas de tercera generación tiene una frecuencia de mutación inferior a 1×10^{-9} . Estas mutaciones, a veces denominadas ligeras, son suficientes para mantener la infección en fluidos y tejidos de un individuo que recibió dosis convencionales de fluoroquinolonas. A partir de esta noción surgió el término de “concentraciones de fluoroquinolonas preventivas de mutantes”, que hace referencia a las concentraciones de antibiótico requeridas para inhibir el crecimiento de mutantes preexistentes en una población bacteriana y con lo cual se previene la selección y surgimiento de cepas resistentes. La resistencia ocurre principalmente por cambios en los aminoácidos, particularmente en sitios específicos de cada subunidad de la enzima a los cuales se les ha llamado región determinada de resistencia a las quinolonas (QRDR, “*quinolone-resistance-determining region*”) los cuales provocan menores sensibilidades a las fluoroquinolonas. El grado de resistencia aumenta conforme los aminoácidos en los sitios blancos de las enzimas cambian por mutaciones adicionales (57 – 59).

A nivel laboratorio se ha observado que las fluoroquinolonas poseen la capacidad de aumentar el porcentaje de bacterias mutantes dado un daño al ADN. Esto activa un sistema de reparación emergente del ADN (“*SOS DNA repair system*”), sobre todo durante el denominado

** postantibiótico: se refiere a una inhibición continua de la división celular en términos de su viabilidad, todo ello como consecuencia a una previa exposición a un antibiótico

tiempo de efecto postantibiótico. Esto necesariamente facilita la selección de mutantes resistentes. Sin embargo, no está bien definida la influencia de las fluoroquinolonas en el aumento de cepas resistentes a nivel clínico (6, 60, 61). Con relación a lo anterior, cabe especular que existen problemas de calidad de los preparados de enrofloxacin en México. Por un lado, se denuncia baja eficacia clínica, mientras que los resultados *in vitro* revelan resistencias a sarafloxacin y al ácido nalidíxico y no resistencia a enrofloxacin por bacterias coliformes (62). No se ha descrito algún tipo de inactivación enzimática de las quinolonas y fluoroquinolonas por las bacterias, sin embargo algunos hongos pueden degradar a las fluoroquinolonas por varias rutas metabólicas (6, 63 - 65).

Se ha documentado que para las fluoroquinolonas, primero surgen las resistencias en especies menos susceptibles en las cuales una mutación simple es suficiente para generar un efecto clínico deficiente (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y posteriormente en bacterias más susceptibles como *Escherichia coli*, *Campylobacter sp* en las cuales es necesario que se genere más de una mutación para que se observen efectos clínicos (6, 66).

5. SISTEMAS DE INFLUJO Y EFLUJO EN CELULAS PROCARIOTES Y EUCARIOTAS.

Las membranas biológicas son uno de los primeros eslabones en la cadena evolutiva, al formar microambientes hidrófilicos, logrando así catalizar eficientemente una gran variedad de reacciones enzimáticas. Las biomembranas constituyen barreras eficientes para moléculas hidrofílicas, las cuales solo pueden entrar a la célula por medio de transportadores específicos, al contrario de lo que ocurre con moléculas anfífilicas las cuales difunden fácilmente a las células (59).

El tubo gastrointestinal representa una de las principales barreras contra microorganismos patógenos y sustancias tóxicas, pero al mismo tiempo representa la principal vía de entrada de nutrientes y fármacos al organismo, por lo cual sus funciones pueden considerarse paradójicas.

Cuando se administra un fármaco oralmente se encuentra con una serie de barreras e interacciones que modifican su velocidad y cantidad de absorción como: altas concentraciones de iones, cambios de pH, degradación enzimática, resistencia a la permeabilidad por parte de la mucosa, permanencia del alimento, velocidad de tránsito, ente otras (67, 68).

En el TGI, siendo el intestino es el principal sitio de absorción por la amplia superficie disponible que posee, los fármacos tienen que atravesar una barrera no solo física, sino fisiológica, enfrentándose a una serie de efectos de repulsión o atracción, dependiendo de sus cargas o de su hidro o lipofobicidad, pueden entrar por canales o encontrarse con algún tipo de acarreador, pueden atravesar por gradientes de concentraciones o ser introducidos por algún tipo de bombas de influjo y ya dentro de la célula o del intersticio pueden ser inhibidos por enzimas o expulsados al lumen nuevamente por bombas de eflujo y por último tienen que experimentar un metabolismo de primer paso a nivel hepático (Cuadro 5) (67).

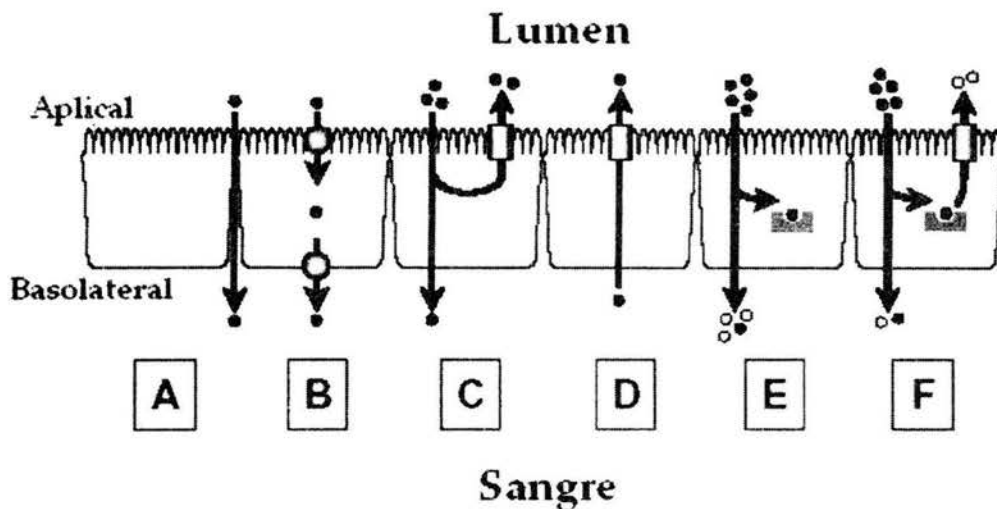
Cuadro 5. Principales factores en la absorción de antibacterianos en dosificaciones orales en aves (67)

Sitio	Parámetros
Influencias lumbinales	Tiempo de estancia Efectos del contenido Vaciamiento Estados de salud Edad Rangos de pH del sitio y del fármaco (capacidad buffer) Estabilidad del fármaco Actividad enzimática en la zona Solubilidad
Mucosa y glucocalix	Difusión del fármaco Uniones específicas y no específicas Repulsión de cargas
Epiteliales	Tamaño molecular (características fisicoquímicas) Lipofobicidad/hidrofobicidad (coeficiente de partición) Bioadherencia Bombas de eflujo- influjo Transportadores, receptores y sitios de acción

A nivel micro-topográfico existen dos vías por medio de las cuales los fármacos pueden moverse a través del epitelio intestinal: entre células adyacentes (transporte paracelular) o a través de las células (transporte transcelular). El transporte a través del epitelio puede ocurrir bidireccionalmente tanto de apical a basolateral (movimiento del lumen intestinal al intersticio y a la circulación) ó de basolateral a apical (del tejido al lumen intestinal). Si se comparan las superficies de área de absorción de cada uno de estos niveles topográficos, es claro que es mucho mayor para el transporte transcelular, aunque cualquiera de estos dos transportes pueden ser utilizados por los fármacos para entrar ya que no existe un criterio estricto que impida que un fármaco utilice cualquiera de ellos o ambos (Cuadro 6, Figura 6) y dada la participación del transporte activo, no es posible asignar mayor o menor eficiencia de transporte a cualquiera de éstas dos vías generales (67).

Cuadro 6. Principales vías de entrada de los fármacos (67)

Tipo de moléculas	Transporte
Pequeñas partículas anfipáticas	Vías transcelular Via paracelular
Pequeñas partículas hidrófilicas	Restringidas a un transporte paracelular o a través de canales hidrófilos
Pequeñas partículas hidrofóbicas	Transporte paracelular
Péptidos y proteínas	Pobremente absorbidos Generalmente requieren de transportadores
Partículas grandes hidrófobas	Vías transcelular y paracelular
Partículas grandes hidrófilicas	Transportadores específicos
Partículas grandes anfipáticas	Vía paracelular



(A) Absorción por vía paracelular restringida a las uniones estrechas. (B) Transporte transcelular mediado por acarreadores apicales o basolaterales. (C) Transportadores de eflujo en la membrana apical los cuales regresan los fármacos al lumen intestinal, restringiendo su absorción a la sangre. (D) Transportadores de eflujo apical que facilitan la eliminación de fármacos presentes en sangre. (E) Metabolismo enzimático intracelular que modifica los fármacos antes de llegar a la sangre. (F) Transportadores de eflujo apical y metabolismo intracelular que metabolizan y excretan los fármacos. (67)

Figura 6. El epitelio intestinal como barrera selectiva de absorción de fármacos.

En general la permeabilidad de las estructuras del TGI a los fármacos disminuye conforme se avanza por el intestino. Es de gran importancia considerar que la absorción y distribución de un fármaco están influenciadas por la concentración y la proximidad que este tenga con sus sitios de acción, mientras que la biotransformación y la excreción son los responsables del tiempo que dure su acción en el organismo (69). La relación existente en la acumulación de quinolonas en las células ha sido un punto de investigación continua. Se ha propuesto que las quinolonas penetran y atraviesan a las células por medio de dos vías: la hidrófila por canales de porinas (sujeta a gradientes de concentraciones) y la hidrófoba, por la membrana fosfolipídica, cualquiera de estas rutas involucra el desplazamiento de cationes divalentes en la membrana lipopolisacárida de la bacteria. (23). En cualquier caso los medicamentos deben pasar de un sitio a otro a través de membranas o barreras ya sea para entrar a las bacterias o para atravesar las barreras fisiológicas y llegar a su sitio blanco.

Las fuerzas de transporte en cinética de primer orden están dadas por la solubilidad de la sustancia a la barrera y por la concentración de dicha sustancia. El transporte es pasivo, a través de membranas, dependiente de esos gradientes de concentración. Por lo que esta forma de desplazamiento de los fármacos es regida por leyes fisicoquímicas simples definidas por los gradientes de concentración no iónica según la ley de Fick (67).

Como es sabido las membranas biológicas son barreras para compuestos hidrofílicos los cuales necesitan de vías especiales para poder atravesar las membranas de los enterocitos, por el otro lado para los compuestos anfífilos les es sumamente fácil. Los principal mecanismo de entrada de los antibióticos a los enterocitos y de ahí a circulación sistémica es por medio de transporte activo, pasivo, difusión, acarreadores o cotransportadores; sin embargo, aunque desde hace algunos años es conocida la presencia de bombas de eflujo e influjo, tienen poco tiempo que se ha empezado a reconocer su importancia en los mecanismos de absorción de antibióticos y de resistencias bacterianas, en fechas recientes se han empezado a caracterizar las proteínas y estructuras que conforman a este tipo de bombas, siendo ya un número bastante grande de ellas identificadas en el transporte de antibióticos en las bacterias (Cuadro 7) y en menor proporción las existentes dentro del organismo de los animales. De aquí la importancia de saber para cuales antibióticos no existen bombas de eflujo y más importante todavía el saber que bombas de eflujo se pueden inhibir para promover la introducción de los antibacterianos a la bacteria directamente (59, 65).

Cuadro 7. Clasificación de las principales familias de bombas de eflujo (59, 65)

Mecanismo	Superfamilia	Subfamilia	Nombre de la bomba
Transporte activo (simport, antiport, uniport)	Pequeña Resistencia Multifármacos, (SMR “small resistance multidrug”)	Pequeño eflujo multifarmacos	EmrE Mmr
	Transporte Endosomal Multifármaco		MTP
	Resistencia a la División Nodular (RND “resistance nodulation cell division family “)	Eflujo hidrófobo anfifílico	Acr Mex MtrD AmrB
	Facilitadores Mayores (MF “major facilitator superfamili”)	Antitransportadores H ⁺	Tet , CmlA, Bcr, NorA, Blt, EmrB, MdfA, LfrA Mef , Cmr, Tap
Transporte Activo Primario	ABC -ATP	Exportadores de fármacos	MsrA, LmrA, OleC, SrmB, Tirc
		Resistencia multifármacos	MDR1
		Resistencia pleiotropica a los fármacos	Pdr5, Snq2, CDR1, AtrA
		Transporte Conjugado	Tcf1, Yor1, MRP1-6

Como se ha venido mencionando, la absorción intestinal de los medicamentos involucra mecanismos de difusión pasiva dentro de los cuales la liposolubilidad es uno de los factores determinantes. Sin embargo, hay componentes hidrosolubles como los aminoácidos y los azúcares que pueden desplazarse a través de las membranas celulares por mecanismos especializados de transporte mediados por transportadores o acarreadores. Se ha sugerido que estos transportadores contribuyen con la absorción intestinal de ácidos monocarboxílicos protonados y aniones antipolares y que estos mecanismos son pH dependientes. Por lo que se les ha considerado como un mecanismo alternativo a la difusión pasiva, mejorando la absorción de sustratos específicos. Si se logra identificar la naturaleza y mecanismos de acción de estos cotransportadores se podría influir en la absorción de enrofloxacin.

Como se mencionó anteriormente y considerando que el principal medio de dosificación en aves es por medio dosis tipo bolo oral y que el proceso de absorción involucra uno proceso digestivo, se ha reconocido recientemente al eflujo activo y a la fase I y II del metabolismo intestinal como los principales determinantes de la biodisponibilidad (F) oral de muchos fármacos (9, 70 -72) .

Más aún, en recientes estudios se considera al citocromo P-450 y 3A4 (principales enzimas metabólicas durante la fase I) y a las bombas de eflujo multifármacos, MDR o P-glicoproteína (PGP), que se encuentran presentes en las microvellosidades de los enterocitos del intestino delgado, como la primera barrera en la biodisponibilidad de un fármaco (73, 74), en últimas fechas se sabe que es 16 veces mayor el porcentaje de actividad enzimática en el lumen intestinal que en el borde de cepillo de los enterocitos (75).

Para muchos autores las bombas de eflujo son una parte complementaria del citocromo P₄₅₀ o cualquier otra enzima que interfiera en la inactivación de los antibióticos, ambos sistemas sin embargo presentan las características de una especificidad total y una posibilidad de trabajo en equipo en contra del fármaco como protección de la bacteria (73).

Las sistemas d bombas presentes en las bacterias han sido clasificados dependiendo de diversos criterios, ya sea por su relación filogenética, fuente de energía o especificidad de sustrato, por lo cual se ha tomado como general una nomenclatura de 4 dígitos en las cuales se engloban los tres puntos anteriores. La mayor parte de las bombas de eflujo de los eucariotas se encuentran dentro del grupo denominado transporte activo primario, las cuales utilizan varias formas de energía y actúan contra diversos fármacos y el segundo grupo denominado transporte activo secundario, actúa principalmente por medio de transportadores y antitransportadores, generalmente contra un gradiente de energía, los cuales son predominantes en bacterias. Dentro de los principales transportadores de eflujo se menciona que se dividen en tres superfamilias de proteínas membranales: la familia del facilitador mayor (MF); pequeña resistencia multifármacos (SMR) y las familia de transportadores ATP unión específica ("*binding cassette*" ABC); dentro de sus formas de energía se menciona que los ABC utilizan

energía de la hidrólisis del ATP y los MF y SMR utilizan un gradiente electroquímico con el cual se intercambian protones externos por fármacos (Cuadro 8) (65).

Cuadro 8. Principales bombas de eflujo y antibacterianos sobre los cuales actúan para generar resistencia (65).

Bombas de eflujo bacterianas		Antibiótico
Transportadores de oligopéptidos sep-T-1 (1)		Antibióticos β -lactámicos
Acarreador- H^+ - Mediado		Quinolonas
PepT1 (5)		β -lactámicos
Bomba de eflujo-ATP dependiente		Ciprofloxacina
SMR Actúa sobre multicaciones lipofílicas		Tetraciclinas, Eritromicina , Sulfadiazina
RND Actúa sobre sustratos cargados anfifílicos		Tetraciclinas, Fluoroquinolonas, Eritromicina, Rifampicina, β -lactámicos, Cloranfenicol Aminoglicósidos
MFS Actúa sobre sustratos mono o di catiónicos anfifílicos		Tetraciclinas, Fluoroquinolonas, Eritromicina, Lincosamidas, Rifampicina, Pristinamicina, Cloranfenicol, Aminoglicósidos
ABC	MDR. Actúa sobre sustratos catiónicos o neutros anfifílicos	Fluoroquinolonas, Lincosamidas, Macrólidos, Rifampicina, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Aminoglicósidos
	MRP1-6. Actúa sobre sustratos orgánicos, aniónicos y posiblemente hidrofóbicos	Fluoroquinolonas, Tetraciclinas, Macrólidos

Las MDR se encuentran presentes en la mayoría, si no todas, las bacterias, incluyendo las cepas silvestres susceptibles a quinolonas y otros antibacterianos, la inactivación de algunas bombas dan paso a hipersusceptibilidad a las fluoroquinolonas, contrariamente bajos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas pueden ocurrir por un incremento en la expresión de estas bombas, generalmente dado por mutaciones. Dentro de la familia de fluoroquinolonas existen diversas susceptibilidades de las bombas de eflujo, siendo algunas pobremente usadas como sustratos para las bombas. La hidrofobicidad parece ser una, pero no la única propiedad de las fluoroquinolonas que afecta su transporte por este tipo de bombas (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Ejemplos de los principales transportadores para las fluoroquinolonas en bacterias Gram positivas y negativas (74)

Especie bacteriana	<i>Componentes del sistema de eflujo</i>			
	Bomba	Proteína de fusión membranal	Proteína membranal externa	Gen regulatorio de la mutación
<i>Bacterias Gram negativas</i>				
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	MexB, MexD, MexF, MexY	MexA, MexC, MexE, MexX	OprM OprJ OprN OprM	mexR nfxB mexT mexZ
Escherichia coli	AcrB	AcrA	TolC	AcrR, marA, robA, soxS
<i>Bacterias Gram Positivas</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	NorA	-	-	Promotor de mutación flqB, arIRS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PmrA	-	-	¿?

Se ha visto que las fluoroquinolonas son transportadas fuera de la *Escherichia coli* por un sistema de eflujo accreador-mediado dependiente de energía PMF (“proton motive force”) (76), el cual ha demostrado ser un *acrAB* (bomba de eflujo multiantibióticos que es inhibida por la carbonil cianida *m*-clorofenil-hidrazona relacionada a la TolC (proteína membranal externa)

Otro tipo importante de barrera lo constituyen los transportadores ABC. En este grupo se incluye una gran diversidad de proteínas transportadoras membranales, que utilizan la energía liberada de la hidrólisis del ATP para translocar solutos a través de membranas. Los miembros de esta familia no solo translocan nutrientes. También participan en una gran variedad de procesos como señales de transducción, presentación de antígenos, patogénesis bacteriana, esporulación, resistencias bacterianas, solo por mencionar algunos. Los transportadores-ABC han sido identificados tanto en organismos eucariotas como en

procariotas y posiblemente se pueda considerar que tengan un precursor proteínico común desarrollado para atravesar la doble capa lipídica en contra de un gradiente de concentración (77, 78). La explicación sobre el mecanismo por medio del cual los transportadores-ABC ejerce su función ha sufrido cambios y no está bien definida. Se investiga actualmente la estructura y función principal de las subunidades que los conforman. Una gran variedad de inhibidores ATPasas afectan de manera variable las funciones del grupo ABC (79–83).

A partir de estudios de biodisponibilidad (F) se ha intensificado la investigación del uso de transporte de fármacos mediado por acarreadores. Se ha propuesto que el transporte mediado por acarreadores, ya sea con H^+ o con Na^+ , juega un papel importante para determinar la F de los medicamentos. Aún a la difusión transcelular en el intestino basada en la hipótesis del coeficiente de partición-pH de fármacos monocarboxílicos, se le atribuye un transporte H^+ -dependiente. Además de su identificación en el intestino delgado, se ha encontrado este acarreador en el hígado, riñón, corazón y cavidad bucal. Reciente e inesperadamente se encontró un acarreador Na^+ -mediado en la conjuntiva pigmentada de conejos para la absorción de fármacos monocarboxílicos como los antiinflamatorios no esteroideos y las fluoroquinolonas (73, 74).

El estudio de los sistemas de transporte de fármacos a través de membranas está destinado a jugar un papel importante en la generación de una nueva fórmula de manipular la farmacocinética de muchos agentes. Se podrá teóricamente desarrollar moléculas acopladas a transportadores o mejorar las ya existentes con vehículos estratégicos favoreciendo transportadores específicos de ingreso o para evitar que sean expulsados por las bombas de extrusión, considerando los grandes avances que se tienen en la identificación de las proteínas y conformación de los principales sistemas de eflujo de las bacterias contra diversos antibacterianos (Cuadro 10), con lo cual se lograría mejorar la biodisponibilidad de todos ellos y en el caso de este estudio, de la enrofloxacin (82 - 84).

Cuadro 10 . Principales bombas de eflujo bacterianas, bacterias que las poseen y antibióticos sobre los cuales actúan (82 - 84).

TRANSPORTADOR DE EFLUJO	ANTIBIÓTICO	BACTERIA
YkkCD	Estreptomicina, tetraciclinas	Bacillus subtilis
Mmr	Eritromicina	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
TetA	Tetraciclinas	<i>Escherichia coli</i>
EmrB	Acido nalidixico	<i>Escherichia coli</i>
MdfA/Cmr/CmlA	Tetraciclinas, eritromicina, neomicina, cloranfenicol, rifampicina, aminoglicósidos, fluoroquinolonas	<i>Escherichia coli</i>
VceB	Ácido nalidixico, eritromicina	<i>Vibrio cholerae</i>
TetK	Tetraciclinas	<i>Staphylococcus aureus</i>
NorA	Fluoroquinolonas	<i>Staphylococcus aureus</i>
PmrA	Fluoroquinolonas	<i>Staphylococcus pneumoniae</i>
Bmr	Fluoroquinolonas, cloranfenicol	<i>Bacillus subtilis</i>
MdrL	Cefotaxima eritromicina	<i>Listeria monocitogenes</i>
Tap	Tetraciclinas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Tap	Tetraciclinas, gentamicina	<i>Micobacterium fortuitum</i>
TetK, TetL, TetM	Tetraciclinas	<i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i>
TetA, B, E	Cloranfenicol, ácido nalidixico, tetraciclinas	<i>Escherichia coli</i>
Tetc.	Tetraciclinas	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
TetH	Tetraciclinas	<i>Pasteurella multocida</i>
MsrC	Macrolidos	<i>Enterococcus sp.</i>
LfrA	Fluoroquinolonas	<i>Micobacterium smegmatis</i>
AcrB	Eritromicina, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, ácido nalidixico	<i>Escherichia coli</i>
AcrB	Eritromicina, rifampicina	<i>Haemophilus influenzae</i>
CmeB	Ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas,	<i>Campylobacter jejuni</i>
Mex	Eritromicina, aminoglicósidos, β-lactámicos, inhibidores de β-lactamasas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, rifampicina, tetraciclinas.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
MexAB-OprM	fluoroquinolonas	<i>Pseudomona aeuuginosa</i>
PBP*	Oxacilina	<i>Staphylococcus sp.</i>
Msr	Macrolidos	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Mef	Macrolidos	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
EmrE	Eritromicina, sulfas, tetraciclinas	<i>Escherichia coli</i>
EmrB	Acido nalidixico	<i>Escherichia coli</i>
Mmr	Eritromicina	<i>Micobacterium tube-culosis</i>
Acr	β-latámicos, cloranfenicol, eritromicina, ácido nalidixico, rifampicina, tetraciclinas	<i>Escherichia coli</i>
AmrB	Aminoglicósidos, eritromicina	<i>Bacillus pseudomalei</i>
CmlA	Cloranfenicol	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Bcr	Sulfas	<i>Escherichia coli</i>
NorA	Cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclinas	<i>Staphilococcus aureus</i>
Blt	Cloranfenicol, fluoroquinolonas	<i>Bacillus subtilis</i>

* Proteína unida a penicilinas "penicillin binding protein"

La mayoría de los promotores de la absorción se han clasificado dentro de las categorías de : detergentes o surfactantes, no surfactantes, ácido grasos, sales biliares y agentes quelantes (cuadro 11), todos ellos provocando un aumento de la absorción por uno o más mecanismos, ya sea alterando las cargas de la membrana, haciendo más fluida la bicapa lipídica, afectando las uniones estrechas, inactivando o disminuyendo las reacciones enzimáticas, inhibiendo bombas de eflujo o influenciando la entrada del fármaco por alguna otra vía. Algunos de estos agentes provocan daños celulares, pudiendo ser considerados como potencialmente tóxicos. Sin embargo, la gran capacidad de recuperación de la mucosa intestinal actúa a su favor (la regeneración completa del epitelio tarda aproximadamente una semana y se pueden reparar pequeños daños en cuestión de horas o de pocos días (cuadro 12).

Cuadro 11. Clasificación de los promotores de la absorción y ejemplos de utilizados la promoción de la absorción intestinal

Clasificación	Promotor
Sales biliares	Clorato de sodio, desoxicolato de sodio
Surfactantes no iónicos	Polisorbatos y alquil ester polioxietilén y éteres
Surfactantes iónicos	Lauril sulfato de sodio y dioctil sulfosuccinato
Ácidos grasos	Caprato de sodio y ácido oléico
Glicéridos	Glicéridos de cadena media, fosfolípidos
Acil carnitinas	Palmitoil carnitina
Agentes quelantes	EDTA
Polímeros	Policarbofil y quitosan

Cuadro 12. Promotores de la absorción más utilizados

Tipo	Ejemplos	Mecanismos de acción
Surfactantes sintéticos	Lauret-9 Lauril sulfato de sodio Polisorbitol 20 y 80 Laurato PEG-8 Lurato sorbitol Gliceril monolaurato Saponinas	Interacción membranar Extracción de proteínas y lípidos Solubilización de péptidos
Sales biliares	Deoxicolato de sodio Glicolato de sodio Fusidato de sodio Tetrahidrofusidato de sodio	Desnaturalización de proteínas Disminución de la viscosidad del mucus Disminución de la actividad de la peptidasa Formación de micelios reversibles
Ácidos grasos	Ácido oléico Ácido aprílico Ácido laurico Palmitoil carnitina EDTA Na ₂	Ruptura de la cadena acil
Quelantes	EDTA Na ₂ Ácido cítrico	Complejos con el Ca ²⁺ (influencia sobre las uniones estrechas)
Complejos de inclusión	Ciclodextrinas y derivados	Incremento de la estabilidad peptídico Incremento de la solubilidad Inhibición enzimática
Otros agentes	Azone [®]	Ruptura de la estructura lipídica

6. BIOEQUIVALENCIAS.

Un problema que el médico veterinario enfrenta a diario en nuestro país es la sustitución de medicamentos originales por medicamentos similares (genéricos). A efectos de llevar a cabo esta sustitución debe disponer de la evidencia científica que le permita el conocer el desempeño farmacocinético y especialmente, la biodisponibilidad de este medicamento sustitutivo en relación al original, para lo cual los estudios de bioequivalencia dan la respuesta a esta pregunta al aportar la evidencia para decidir la sustitución. La premisa de la cual se parte es demostrar que el principio activo del medicamento genérico tiene el mismo desempeño farmacocinético que el original, para entonces poderlo considerar como intercambiable y la evidencia de eficacia clínica y seguridad del original se aplica al genérico (85 – 87) .

Es pertinente en este momento decir que dos medicamentos son equivalentes farmacéuticos si contienen el o los mismos principios activos en similar forma farmacéutica para la misma vía de administración y cumplen con los requisitos establecidos en la farmacopea (identidad, potencia, pureza, uniformidad del contenido, velocidad de disolución, etc.). Y dos productos equivalentes farmacéuticos se consideran equivalentes biológicos o bioequivalentes cuando la diferencia entre la magnitud y la velocidad de absorción (biodisponibilidad) del principio activo en ambos productos no es estadísticamente significativa en una misma matriz biológica. Dado lo anterior se puede decir que una equivalencia químico-farmacéutica no implica necesariamente una bioequivalencia.

Al realizar estudios de bioequivalencias se busca que la biodisponibilidad de el o los productos evaluados no difieren en más de un 20% con respecto al de referencia. Se ha evaluado que una tolerancia del 20% no tiene consecuencias clínicas relevantes en un tratamiento farmacológico, el sobrepasar estos límites en mayor o menor grado representa diferencias clínicamente relevantes en la intensidad del efecto terapéutico, o en efectos colaterales. Los principales parámetros de biodisponibilidad evaluados para definir la existencia o falta de bioequivalencias son el área bajo la curva (AUC), concentración máxima (C_{MAX}), (se han propuesto reemplazarla por C_{MAX}/AUC), y la vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$), como valores de cuantificación de la cantidad y velocidad de absorción y eliminación

del fármaco. En el cuadro 13 se muestran los criterios aceptados por diversos países para determinar bioequivalencias en las formulaciones (86). La FDA asigna límites de confiabilidad del 90% en bioequivalencia cuando los valores para el AUC y C_{MAX} con respecto al producto de referencia se encuentra en un 80 a 125%, con lo cual acepta una variación del 20 a 25%.

Cuadro 13. Comparación de algunos requerimientos de bioequivalencias entre Estados Unidos de Norte América, Canadá y la Comunidad Económica Europea (86).

Evaluación	FDA	TPD	EMEA
Principales parámetros de evaluación	C_{MAX} , AUC_0 , AUC_{inf}	C_{MAX} , AUC_0	C_{MAX} , AUC_0 , AUC_{inf}
CI en C_{MAX}	Si, 80 - 125	Si, 80 - 125	Si, 80 – 120
Metabolitos	Como soporte cuando se forma durante/después del el proceso de absorción	No usualmente	Si, cuando el fármaco es un profármaco y el metabolito ayuda a mejorar su eficacia
Estado estable	No	Si, cuando los valores de AUC_x/AUC_{inf} son inferiores al 80%	Si, cuando la formulación es de liberación sostenida o transdermal
Efecto del alimento	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles	Si, siempre y cuando el alimento afecte los niveles
Porcentaje mínimo de la AUC observada	Mayor al 88%	Mayor al 80%	Mayor al 80%

FDA = Estados Unidos de Norteamérica. (“Food and drug administration); TPD = Canadá. (“Therapeutic Products Directorate”); EMEA = Comunidad Económica Europea (“European Agency for the Evaluation of Medicinal Products “); C_{MAX} = Máxima concentración obtenida; AUC_0 = Área bajo la curva concentración/tiempo del tiempo 0 a la última concentración detectable; AUC_{inf} = Área bajo la curva concentración/tiempo extrapolada a infinito



Strategic Administration of Enrofloxacin in Poultry to Achieve Higher Maximal Serum Concentrations

L. H. SUMANO, O. L. GUTIERREZ and Q. M. ZAMORA

Department of Physiology and Pharmacology, School of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico 04510, Mexico

SUMMARY

To achieve a higher maximal serum concentration ($C_{S_{max}}$) of enrofloxacin after oral administration of 10 mg/kg/day of three commercial preparations of enrofloxacin to chickens, two concentrations of the drug were tested (0.1 and 0.2%), under controlled laboratory conditions. A single oral bolus dose was delivered directly into the proventriculus of each of 240 chickens, which were equally divided into six groups: three received the customary concentration (0.1%), and three received the higher concentration.

A quantitative/qualitative microbiological analytical method to determine serum concentrations of enrofloxacin and a software program to obtain pharmacokinetic variables, revealed that time *vs.* concentration relationships best fitted double peak shape curves, $C_{S_{max1}}$ and $C_{S_{max2}}$. Statistically significant ($P > 0.01$) increments were obtained when 0.2% enrofloxacin oral solutions from the three different commercial preparations were administered. The increments ranged from 175% to 338% for $C_{S_{max1}}$ and 69% to 342% for $C_{S_{max2}}$. Optimal bactericidal concentrations of enrofloxacin are usually twice the value of their minimal inhibitory concentration.

Although clinical trials are now required, it would appear that increments in the serum concentration of enrofloxacin may reduce to the rate at which bacterial resistance occurs and so increase clinical efficacy without affecting the cost per treatment.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: Enrofloxacin; chicken; maximal serum concentration; higher concentrations; pharmacokinetics.

INTRODUCTION

Intensive and economically viable production of chicken meat often requires the administration of antibacterial drugs to treat specific outbreaks of bacterial diseases. In many countries, enrofloxacin has become the drug of choice for many such cases and is the most potent antibacterial drug so far used in poultry medicine. Careless use however may both select for a resistant population of bacteria and reduce clinical efficacy. This is an emerging problem worldwide, particularly in countries where enrofloxacin is readily available and tends to be much

overused (Sumano, 1993; Brown, 1996; Aarestrup *et al.*, 1997; Sumano & Gutierrez, 2000).

It has been stated that the antibacterial effects of enrofloxacin at the clinical level are more dependent upon a greater peak in serum concentration than an extended residence time (Puyt, 1995; Brown, 1996; Riviere, 1999; Sumano & Gutierrez, 2000). For this reason, it is generally recommended that enrofloxacin should be administered to chickens by bolus administration. A bolus-like dose of enrofloxacin is more likely to produce a higher maximum serum concentration ($C_{S_{max}}$) in the shortest possible time (T_{max}) (Dorrestein & Van Miert, 1988; Wages, 1997; Sumano *et al.*, 2000). However, to prevent a reduction in the antibacterial activity expected from enrofloxacin, and to optimize its clinical efficacy, some precautions must be observed. These include the avoidance of hard water as a vehicle (Sumano, 1993; Russel,

Correspondence to: Department of Physiology and Pharmacology, School of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico 04510, Mexico. Tel.: +52-5-56-22-59-08; E-mail: sumano@servidor.unam.mx, sumanolh@hotmail.com

1992; Tanner, 1993), the use of clean water pipes and no galvanized water tanks, and the prevention of direct light exposure of medicated water (Dorrestein & Van Miert, 1988; Tanner, 1993; Wages, 1997; Sumano *et al.*, 2000). The restriction of drinking water for approximately 1 h to ensure rapid consumption of the set dose of the antibacterial is also desirable. Ideally, dispenser-machines should be used and the established dose, expressed in mg/kg, added to the dispenser after calculating the water consumption of the affected flock. Alternatively, daily water consumption and water consumption during the actual medication time should be closely estimated to calculate the amount of drug to be added to the tank (Dorrestein & Van Miert, 1988; Tanner, 1993).

The aim of this study was to evaluate whether or not the administration of a concentrated form of enrofloxacin (0.2%) in the drinking water could significantly increase $C_{S_{max}}$ and reduce T_{max} , compared with the administration of the customary concentration of the drug (0.1%) when given at the same dose rate (10 mg/kg).

MATERIALS 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.

Pharmacokinetic analysis of three commercial preparations of enrofloxacin (A, B, and C), using the same dose (10 mg/kg), but at two concentrations: 0.1% and 0.2%, was carried out at the experimental poultry farm of the Veterinary College, National Autonomous University of Mexico. Although the sources of the enrofloxacin did not allow their names to be revealed, the chemical identity of the three preparations of 10% enrofloxacin was confirmed as previously described (Sumano *et al.*, 1994; Sumano & Ocampo, 1995).

Two hundred and forty, Arbor-Across broilers, weighing approximately 750 g, were used. All were clinically healthy and had not been medicated with any antibacterials. The birds were randomly divided into six groups of 40: odd numbered groups received the customary dilution of enrofloxacin (0.1%) (A1, B3, C5) and even numbered groups received the two-fold concentrated form of the drug (0.2%) (A2, B4, C6). To minimize variations in absorption between birds due to enrofloxacin-feed interactions (Radandt *et al.*, 1992), the birds were fasted for 6 h before dosing.

Each chicken was individually weighed, and then received a single oral bolus dose of enrofloxacin by means of a semi-rigid tubing, which allowed the drug to be placed directly into the proventriculus. The drug was administered in a total volume of approximately 1–1.5 mL/chicken in the 0.1% groups and half of that volume in the 0.2% groups. Technical staff were employed to ensure minimal delays between administration of the drug and blood sampling from the wing vein. The time to obtain a blood sample never exceeded 2 min.

Blood samples were taken from five birds at a 25 and 45 min, 1.5, 3, 6, 9, 12, and 24 h intervals, and only one sample was taken from each chicken. The blood was immediately centrifuged, serum recovered, identified, and frozen until analyzed. In this manner at least three complete sets of samples for each preparation of enrofloxacin were obtained.

The determination of enrofloxacin was carried out using the quantitative/qualitative microbiological agar diffusion analysis technique described by Bennet *et al.* (1966), using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the test microorganism and chicken serum as vehicle to obtain a reference linear regression between 0.08 and 10 µg/mL, with a percentage recovery of 94 ± 2.5 and an intra-assay error <5%. Standard enrofloxacin was donated by Bayer of Mexico.

The serum activity/concentrations of enrofloxacin (and active metabolites) *vs.* time relationships were analyzed using software from PKAnalyst (MicroMath. Scientific Software), and fitted best ($r < 0.95$) in model 27. The general formula is:

$$\text{Concentration (time)} = A_1 e^{-B_1 \cdot \text{time}} + A_2 e^{-B_2 \cdot \text{time}} \\ - A_3 e^{-B_3 \cdot \text{time}} + A_4 e^{-B_4 \cdot \text{time}}$$

where the time *vs.* plasma concentration profile is fitted into a three exponential term model with a lag time of 0.02 h. The area under the curve (AUC), β half lives ($T_{1/2\beta}$), maximal serum concentration ($C_{S_{max}}$), time to reach $C_{S_{max}}$ (T_{max}), and absorption half life ($T_{1/2\text{abs}}$), values were recorded either from the program or utilizing standard formulas (Rowland & Tozer, 1995).

The mean values of the serum concentrations of enrofloxacin from the three groups (A, B, and C), and the two concentrations tested (0.1% and 0.2%) were compared using a non-parametric Kruskal-Wallis analysis, through the software package JMP (JMP Statistic Mode Visual 1989–1995 SAS Institute). As the data showed a non-normal distribution, individual pharmacokinetic values were compared using Dunn tests, after a Kruskal-Wallis analysis.

RESULTS

Fig. 1 shows the mean serum concentrations obtained for enrofloxacin in the three groups dosed with the customary dilution of the drug (0.1%), using three different commercial formulations (A1, B3, C5), and the corresponding values ob-

tained for groups A2, B4, C6, whose chickens received the same dose but at twice fold the concentration. Table I gives derived pharmacokinetic variables.

Two $C_{S_{max}}$ values were obtained for each of the three preparations of enrofloxacin. $C_{S_{max1}}$ values were statistically higher in all three even number

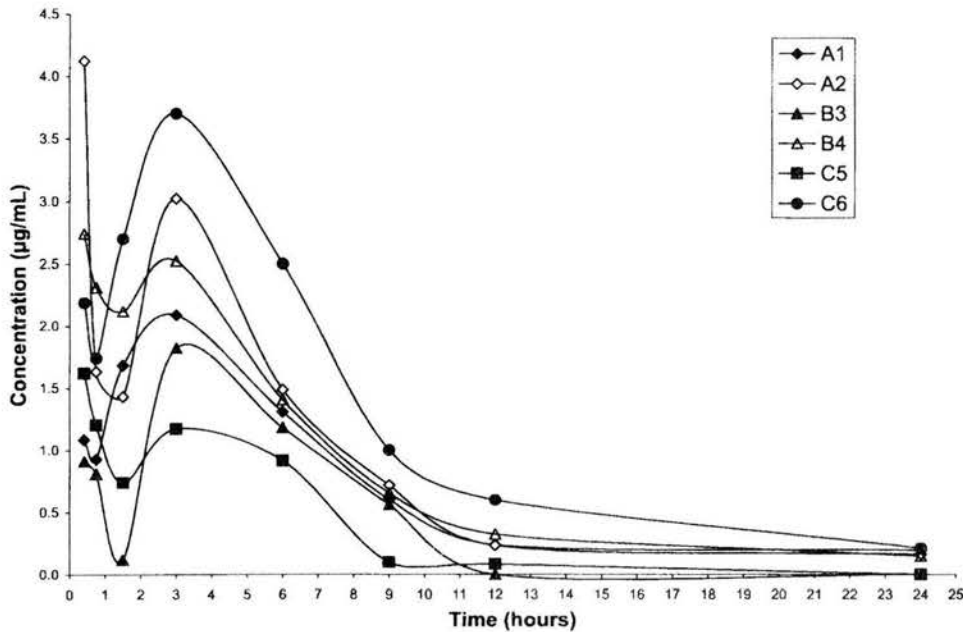


Fig. 1. Mean serum concentration/activity of enrofloxacin ($n = 40$) in chickens after a single oral bolus dose of 10 mg/kg of a commercial preparation of the drug, administered either at a concentration of 0.1% (A1, B3, C5) or 0.2.

Table I

Pharmacokinetic variables obtained after a single bolus dose of one of three commercial preparations of enrofloxacin (A, B, C), at a dose of 10 mg/kg, delivered into the proventriculus by a semi-rigid tubing at a concentration of 0.1% (odd numbers) and 0.2% (even numbers)

Variable	Group A1 $X \pm SD$	Group A2 $X \pm SD$	Group B3 $X \pm SD$	Group B4 $X \pm SD$	Group C5 $X \pm SD$	Group C6 $X \pm SD$
$T_{1/2abs}$ (min)	8.2 ± 1.2	8.5 ± 1.3	8.0 ± 1.6	7.9 ± 1.8	8.2 ± 1.6	8.0 ± 1.4
β_1	0.250 ± 0.002	0.320 ± 0.002	0.246 ± 0.005	0.330 ± 0.003	0.286 ± 0.003	0.400 ± 0.355
β_2	0.028 ± 0.022	0.040 ± 0.038	—	0.048 ± 0.005	0.013 ± 0.002	0.050 ± 0.180
$T_{1/2\beta}$ (h)	2.750 ± 0.023	2.160 ± 0.016	2.810 ± 0.032	2.100 ± 0.032	2.420 ± 1.581	1.780 ± 0.023
$C_{S_{max1}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	1.300 ± 0.036	4.400 ± 0.016	1.000 ± 0.058	2.820 ± 0.034	1.600 ± 0.025	4.300 ± 0.235
$C_{S_{max2}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	2.00 ± 0.054	2.900 ± 0.071	1.800 ± 0.520	2.500 ± 0.045	1.200 ± 0.084	4.100 ± 0.098
AUC	15.96 ± 0.032	19.33 ± 0.020	10.05 ± 0.041	19.27 ± 0.034	8.060 ± 0.016	28.94 ± 0.455
T_{max1} (h)	0.830 ± 0.025	0.500 ± 0.034	0.480 ± 0.021	0.500 ± 0.036	0.500 ± 0.045	1.500 ± 0.025
T_{max2} (h)	3.000 ± 0.031	3.500 ± 0.027	3.000 ± 0.003	5.500 ± 0.037	2.900 ± 0.065	6.000 ± 0.078

Odd groups received 0.1% enrofloxacin.
Even groups received 0.2% enrofloxacin.

groups (A2, B4, and C6) compared with the data in the odd number groups ($P < 0.05$). The increments ranged from 175% to 338%. $C_{S_{max2}}$ also showed a pattern of increments from 69% in group A to 208% in groups B and C ($P < 0.05$). There were no differences when comparisons were made either within even groups or odd groups. Statistical analysis comparing all variables among all groups revealed that only T_{max1} was sometimes different among preparations of enrofloxacin when given at a concentration of 0.1% or 0.2%.

Serum concentrations of enrofloxacin followed a two phase decay; first a relatively rapid phase (β_1 from 0.25 to 0.40), followed by a slower decay in most cases (β_2 from 0.013 to 0.05). When β_1 and β_2 values were statistically compared between odd and even groups, a faster elimination was observed in all cases for the latter. Correspondingly, $T_{1/2\beta}$ was statistically shorter in groups A2 and B4 when compared with the corresponding A1 and B3 groups. This was not observed in groups C5 vs. C6. Across all groups, the actual values for $T_{1/2\beta}$ did not vary greatly, ranging from 1.78 h in group C6 to 2.81 h in group B3. Statistically significant changes in other variables are shown in Table II.

DISCUSSION

It has been proposed that the quantitative/qualitative bacteriological assay (Bennet *et al.*, 1966) is as reliable as high pressure liquid chromatography for the determination of the serum activity/concentration of enrofloxacin (Küing *et al.*, 1983). Addition-

ally, the composite antibacterial activity measured provides more meaningful results when trying to relate pharmacokinetic variables to clinical outcomes.

The theoretical basis of our trial depended on Fick's laws of passive, non-ionic absorption of drugs. In brief, this states that higher serum concentrations are directly proportional to the rate of absorption, which, in turn, is dependent on higher concentrations at the absorption site (Riviere, 1999). Thus, the aim of our study was to determine whether or not, a higher $C_{S_{max}}$ in a shorter T_{max} could be achieved by the simple manoeuvre of doubling the concentration of enrofloxacin (from 0.1 to 0.2%), without modifying the actual dose (10 mg/kg/day). In this context, we assumed that the hypothesis was true; increments in $C_{S_{max2}}$ ranged from 338.46% in group C6 vs. C5; to 268.75% in group A2 vs. A1. However, neither T_{max} nor $T_{1/2abs}$ were altered as expected. This may have been due to the fast absorption of enrofloxacin and to an insufficient number of early blood samplings after placing the drug in the proventriculus and before the expected $C_{S_{max}}$. Although $T_{1/2\beta}$, bioavailability based on AUC values, T_{max} and $C_{S_{max}}$ were not statistically different between groups A and B in most cases, various comparisons of these data were statistically different when compared to group C birds, particularly those in group C6. The double peak of the serum concentration/activities vs. time curve obtained for all three commercial preparations, is considered to be the result of entero-hepatic recycling which has not been described in other studies (Sumano & Gutierrez, 2000). The manner in which

Table II

Comparison of all variables assessed that are statistically different for the three preparations of enrofloxacin given at a dose of 10 mg/kg in either 0.1% or 0.2% solutions, and among all groups tested

Variable	Among groups dosed either with 0.1 vs. 0.2% solutions	
β_1	A1 vs. C6; B3 vs. A2; B3 vs. B4; B3 vs. C6; C5 vs. C6	
β_2	A2 vs. B3; B3 vs. B4; B3 vs. C6; B4 vs. C5; C5 vs. C6	
$T_{1/2\beta}$ (h)	A2 vs. A1; B4 vs. A1; C6 vs. A1; B3 vs. 6; B3 vs. B4	
$C_{S_{max1}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A1 vs. C6; A1 vs. A2; A2 vs. B3; B3 vs. B4; B3 vs. C6	
$C_{S_{max2}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A1 vs. C6 ; B2 vs. C5 ; A2 vs. B3; B3 vs. C6; B4 vs. C5; C5 vs. C6	
AUC	A1 vs. C6; A2 vs. C5; B3 vs. C6; B4 vs. C5; C5 vs. C6	
T_{max1} (h)	C6 vs. B3; 5 vs. C6	
T_{max2} (h)	C5 vs. C6; C6 vs. B3 C6 vs. A1; B4 vs. C5	
T_{max1} (h)	Among groups dosed with 0.1% solutions	Among groups dosed with 0.2% solutions
	A1 vs. B3	A2 vs. C6; C6 vs. B4

enrofloxacin was administered directly into the proventriculus in the 6 h fasted chickens may account for this effect.

Although the use of enrofloxacin in preventive programs at lower doses (5 mg/kg/day), has been recommended on some occasions (Barbour *et al.*, 1998), usually the drug is administered as the treatment of choice for outbreaks of various diseases such as chronic respiratory disease complicated with *E. coli*, outbreaks caused by *Pasteurella* spp, *Haemophilus gallinarum*, etc. For these purposes a higher dose (10 mg/kg/day) is usually chosen, and with it, a higher $C_{s_{max}}$ value would be expected. Although the clinical significance of doubling the concentration of enrofloxacin requires further field investigations, the fact that the effect of enrofloxacin is more dependent on achieving a higher peak concentration than a long residence time (Puyt, 1995; Brown, 1996; Riviere, 1999; Sumano & Gutierrez, 2000), allows us to speculate that higher $C_{s_{max}}$ values may well result in better clinical outcomes. Moreover, it is important to emphasize that in this trial, the daily total dose was unaltered and therefore the cost of medication would not be increased. In order to achieve the advantage of a greater $C_{s_{max}}$ of enrofloxacin in chickens, the simple manoeuvre of half emptying the water tank or adjusting the dose-dispenser apparatus to double the concentration, would be likely to suffice.

Various reports have warned of the increasing appearance of resistant pathogens common both to chickens and humans, e.g., *Campylobacter* spp; *E. coli*; *Salmonella* spp; (Piddock *et al.*, 1995; Kho *et al.*, 1993; Aarestrup *et al.*, 1997; Jacobs-Reitsman *et al.*, 1994). As the optimal bactericidal concentration of enrofloxacin is usually twice the value of the minimal inhibitory concentration (Sumano, 1983; Brown, 1996) and if the argument of augmented clinical efficacy of higher concentrations of enrofloxacin is sustained, our recommendation could reduce the rate at which bacterial resistance appears and therefore, extend the historical life-span of the drug for clinical use.

REFERENCES

- AARESTRUP, F. M., NIELSEN, E. M., MADSEN, M. & ENGBERG, J. (1997). Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2244–50.
- BARBOUR, E. K., HAMADEH, S., TALHOUK, R., SAKR, W. & DARWISH, R. (1998). Evaluation of enrofloxacin-treatment program against *Mycoplasma gallisepticum* infection in broilers. *Preventive Veterinary Medicine* **35**, 91–9.
- BENNET, J. B., BRODIE, J. L., BENNER, E. J. & KIRBY, W. M. (1966). Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. *American Society of Microbiology* **14**, 170–7.
- BROWN, S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 1–14.
- DORRESTEIN, D. J. & VAN MIERT, A. S. (1988). Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **11**, 33–44.
- JACOBS-Reitsman, W. F., KOENRAAD, P. M. F. J., BOLDER, N. M. & MULDER, R. W. A. W. (1994). *In vitro* susceptibility of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from broilers to quinolones, ampicillin, tetracycline, and erythromycin. *Veterinary Quarterly* **4**, 199–208.
- KHO, H. B., KANG, M. I. & KIM, G. N. (1993). Antimicrobial drugs susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chronic respiratory disease outbreaks. *Korean Journal of Veterinary Public Health* **17**, 63–8.
- KÜNG, K. J., RIONO, L., WOLFFRAM, S. & WANNER, H. (1983). Comparison of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Researches in Veterinary Sciences* **54**, 247–8.
- PIDDOCK, L. J. V., WRAY, C., MCCLAREN, I. & WRISE, R. (1995). Quinolone resistance in *Salmonella* sp.: veterinary pointers. *Lancet* **336**, 125.
- PUYT, J. D. (1995). Antibiotic therapy in poultry production. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* **5**, 17–110.
- RADANDT, J. M., RANDALL, M. C. & DUDLEY, M. N. (1992). Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanism, variability, clinical significance, and management. *Clinical Infectious Diseases* **14**, 272–84.
- RIVIERE, J. E. (1999). *Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques, and Applications*. Ames: Iowa State University Press.
- ROWLAND, M. & TOZER, T. N. (1995). *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications*. 3rd edn.. North Providence Road: Williams & Wilkins.
- RUSSEL, I. D. (1992). Proper water medication with good water systems. *Poultry Digest* **12**, 40–8.
- SUMANO, L. H. (1983). Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria Mexico* **2**, 23–34.
- SUMANO, L. H., GRACIA, M. I., ROMERO, V. & RUIZ-RAMIREZ, L. (1994). The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Veterinary and Human Toxicology* **5**, 476–7.
- SUMANO, L. H., NEGRÓN, G. & FERNÁNDEZ, G. (2000). Consideraciones prácticas y farmacológicas para medicación de antibacterianos en avicultura. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Zulia*. **10**, 251–66.
- 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. & OCAMPO, C. L. (1995). Compositional analysis surveillance of eleven trade brands of enrofloxacin including Baytril, for veterinary use. *Journal Veterinary Medicine* **42**, 669–73.

TANNER, A. C. (1993). Antimicrobial drug use in poultry. In: *Antimicrobial therapy use in veterinary medicine*, eds. J. F. Prescott, & J. D. Baggot, (2nd edn., pp. 507–23. Ames: Iowa State University Press.

WAGES, D. P. (1997). Proper medication procedures. *Poultry Digest* **56**, 18–9.

(Accepted for publication 23 April 2002)

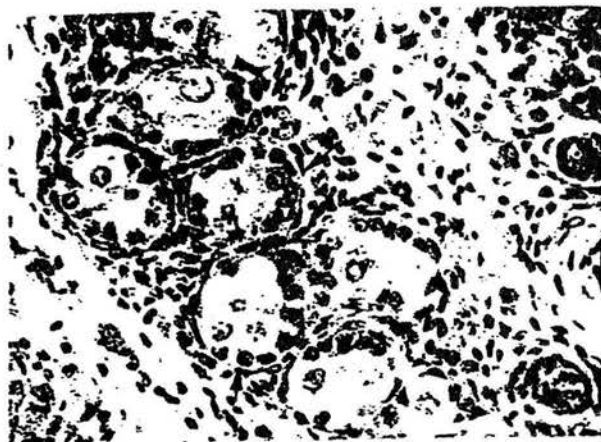


FIG 4: Section of testicular teratoma demonstrating tubular structures (arrows) resembling active seminiferous tubules. Haematoxylin and eosin. x 400

3). Nodules containing loosely arranged bands of fibrous tissue were evident and within these regions tubular structures, resembling inactive seminiferous tubules (Fig 4), and larger ductal structures were observed. In the same region muscle bundles and neural tissue were seen. Other areas of the mass contained discrete nodules of cartilage and components of nerve fibres were also located within expanses of fat. Bone forms were also evident, containing cartilage caps at both poles and having shafts composed of bone with spicules extending into the medulla. The observation of components of neuroectoderm and mesoderm were consistent with a diagnosis of testicular teratoma.

Although teratomas are uncommon in animals other than the horse they have been reported in both the testes and ovaries of canines, the ovaries of cattle and mice, and in the testes of a fox. In fowl, teratomas can occur spontaneously, following the injection of zinc or copper salts into the testis of a cock during a period of spermatogenesis (Willis 1962).

Teratomas are the most common testicular tumours in horses and were reported to occur in 1 to 2.5 per cent of cryptorchid castrations (Willis and Rudduck 1943, Cotchin 1977). Testicular teratomas are most often identified at castration and, therefore, are most commonly encountered in yearlings or older animals. Teratomas have been defined as true neoplasms composed of a number of different tissue types derived from two or more embryonic germ layers. Only one previous report describes a case in a horse under a year of age (Parks and others 1986) and until now this neoplasm has not been recorded in the neonate. Nevertheless, it has been postulated that testicular teratomas may be congenital (Willis and Rudduck 1943) and it has been suggested that the very presence of a teratoma may prevent testicular descent (Cotchin 1977, Jubb and other 1993). In horses teratomas are generally made up of mixed, well differentiated, although organised tissue, and as such are categorised as benign (Innes 1942, Willis and Rudduck 1943, Moulton 1990). These benign tumours are almost always encountered in young animals, corresponding in age to human children in whom teratomas are also of a benign nature. This is in direct contrast to adult human beings in whom malignant teratomas are the rule, occurring at a mean age of 30 years.

In this case, the teratoma was discovered incidentally during laparotomy for the repair of a ruptured bladder, however, the age of the animal at presentation clearly supports the theory of the in utero development of this neoplasm. It is postulated that rupture of the foal's bladder occurred due to congenital defects or compressive forces associated with parturition (Auer and Stick 1999). It is unlikely that the presence

of an abnormally retained teratomatous testicle played any part in the pathogenesis of the foal's condition.

A histological study of equine testes from a large number of descended and cryptorchid castrations, in combination with a study of neonatal testes from foals submitted for post-mortem examination, would provide a more precise incidence rate for this unusual neoplasm and perhaps confirm its likely congenital nature.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr D. McGuinness for referring this case and to Ms S. Worrell, Mr C. King and Mr B. Cloak for their technical assistance.

References

- AUER, J. A. & STICK, J. A. (1999) Bladder. In *Equine Surgery*, 2nd edn. Eds J. D. Lillich, R. M. DeBowes. Philadelphia, W. B. Saunders, pp 596-597
- COTCHIN, E. (1977) Equine testicular teratoma. In *Proceedings of the 6th Perugia Quadrennial Conference on Cancer*, Perugia, Italy, June 30 to July 5, 1977, pp 699-722
- CREW, F. A. E. (1922) A histological study of the undescended testicle of the horse. *Journal of Comparative Pathology* 35, 62-69
- INNES, J. R. M. (1942) Neoplastic diseases of the testis in animals. *Journal of Pathology and Bacteriology* 54, 485-498
- JUBB, K. V. F., KENNEDY, P. & PALMER, N. (1993) The male genital system. In *Pathology of the Domestic Animals*, Vol. 3, 4th edn. Ed P. W. Ladds. London, Academic Press, pp 510-511
- MOULTON, J. E. (1990) Genital systems. In *Tumours in Domestic Animals*, 3rd edn. Eds S. V. Nielson, P. C. Kennedy. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, pp 489-491
- PARKS, A. H., WYN-JONES, G. & COX, J. E. & NEWSHOLME B. J. (1986) Partial obstruction of the small colon associated with an abdominal testicular teratoma in a foal. *Equine Veterinary Journal* 18, 342-343
- WILLIS, R. A. & RUDDUCK, H. B. (1943) Testicular teratoma in horses. *Journal of Pathology and Bacteriology* 55, 165-171
- WILLIS, R. A. (1938) A teratoma of a horse's testis. *Journal of Pathology and Bacteriology* 46, 198-200
- WILLIS, R. A. (1962) Teratomas. In *The Borderland Between Embryology and Pathology*, 2nd edn. Ed R. A. Willis. London, Butterworth, pp 442-462

Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations

O. L. GUTIERREZ, L. H. SUMANO, Q. M. ZAMORA

ENROFLOXACIN is currently the most potent antibacterial drug used in poultry medicine. It has become the drug of choice to treat outbreaks of various bacterial diseases in many countries, for example, chronic complicated respiratory disease, mycoplasmosis, and so on. Overuse of enrofloxacin may result in resistant populations of bacteria and may also reduce its clinical efficacy. There have been warnings of the emergence of resistant strains of important pathogens worldwide (Brown 1996, Aarestrup and others 1997). In countries where many brands of enrofloxacin are readily available, the drug is overused and the bioequivalence of some marketed prod-

Veterinary Record (2002)
150, 350-353

O. L. Gutierrez,
L. H. Sumano,
Department of
Physiology and
Pharmacology, School of
Veterinary Medicine,
National Autonomous
University of Mexico,
Mexico City 04510,
Mexico
Q. M. Zamora, PISA
Agropecuaria SA de CV,
Avenue Miguel Angel de
Quevedo, No 555,
Colonia Romero de
Terreros, Mexico City,
Mexico

Correspondence to
Dr Sumano

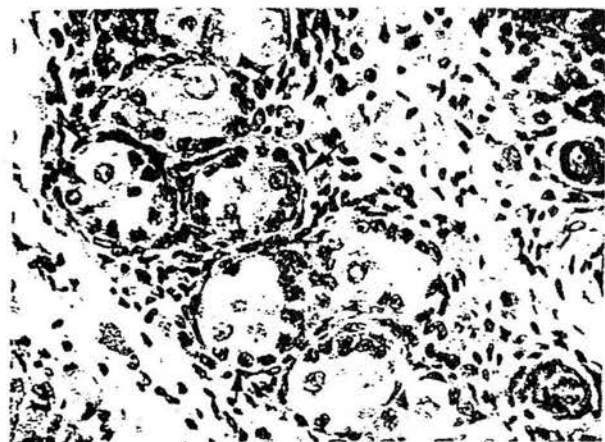


FIG 4: Section of testicular teratoma demonstrating tubular structures (arrows) resembling active seminiferous tubules. Haematoxylin and eosin. x 400

3). Nodules containing loosely arranged bands of fibrous tissue were evident and within these regions tubular structures, resembling inactive seminiferous tubules (Fig 4), and larger ductal structures were observed. In the same region muscle bundles and neural tissue were seen. Other areas of the mass contained discrete nodules of cartilage and components of nerve fibres were also located within expanses of fat. Bone forms were also evident, containing cartilage caps at both poles and having shafts composed of bone with spicules extending into the medulla. The observation of components of neuroectoderm and mesoderm were consistent with a diagnosis of testicular teratoma.

Although teratomas are uncommon in animals other than the horse they have been reported in both the testes and ovaries of canines, the ovaries of cattle and mice, and in the testes of a fox. In fowl, teratomas can occur spontaneously, following the injection of zinc or copper salts into the testis of a cock during a period of spermatogenesis (Willis 1962).

Teratomas are the most common testicular tumours in horses and were reported to occur in 1 to 2.5 per cent of cryptorchid castrations (Willis and Rudduck 1943, Cotchin 1977). Testicular teratomas are most often identified at castration and, therefore, are most commonly encountered in yearlings or older animals. Teratomas have been defined as true neoplasms composed of a number of different tissue types derived from two or more embryonic germ layers. Only one previous report describes a case in a horse under a year of age (Parks and others 1986) and until now this neoplasm has not been recorded in the neonate. Nevertheless, it has been postulated that testicular teratomas may be congenital (Willis and Rudduck 1943) and it has been suggested that the very presence of a teratoma may prevent testicular descent (Cotchin 1977, Jubb and other 1993). In horses teratomas are generally made up of mixed, well differentiated, although organised tissue, and as such are categorised as benign (Innes 1942, Willis and Rudduck 1943, Moulton 1990). These benign tumours are almost always encountered in young animals, corresponding in age to human children in whom teratomas are also of a benign nature. This is in direct contrast to adult human beings in whom malignant teratomas are the rule, occurring at a mean age of 30 years.

In this case, the teratoma was discovered incidentally during laparotomy for the repair of a ruptured bladder, however, the age of the animal at presentation clearly supports the theory of the in utero development of this neoplasm. It is postulated that rupture of the foal's bladder occurred due to congenital defects or compressive forces associated with parturition (Auer and Stick 1999). It is unlikely that the presence

of an abnormally retained teratomatous testicle played any part in the pathogenesis of the foal's condition.

A histological study of equine testes from a large number of descended and cryptorchid castrations, in combination with a study of neonatal testes from foals submitted for post-mortem examination, would provide a more precise incidence rate for this unusual neoplasm and perhaps confirm its likely congenital nature.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr D. McGuinness for referring this case and to Ms S. Worrell, Mr C. King and Mr B. Cloak for their technical assistance.

References

- AUER, J. A. & STICK, J. A. (1999) Bladder. In *Equine Surgery*, 2nd edn. Eds J. D. Lillich, R. M. DeBowes. Philadelphia, W. B. Saunders, pp 596-597
- COTCHIN, E. (1977) Equine testicular teratoma. In *Proceedings of the 6th Perugia Quadrennial Conference on Cancer*, Perugia, Italy, June 30 to July 5, 1977, pp 699-722
- CREW, F. A. E. (1922) A histological study of the undescended testicle of the horse. *Journal of Comparative Pathology* 35, 62-69
- INNES, J. R. M. (1942) Neoplastic diseases of the testis in animals. *Journal of Pathology and Bacteriology* 54, 485-498
- JUBB, K. V. E., KENNEDY, P. & PALMER, N. (1993) The male genital system. In *Pathology of the Domestic Animals*, Vol 3, 4th edn. Ed P. W. Ladds. London, Academic Press, pp 510-511
- MOULTON, J. E. (1990) Genital systems. In *Tumours in Domestic Animals*, 3rd edn. Eds S. V. Nielson, P. C. Kennedy. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, pp 489-491
- PARKS, A. H., WYN-JONES, G. & COX, J. E. & NEWSHOLME B. J. (1986) Partial obstruction of the small colon associated with an abdominal testicular teratoma in a foal. *Equine Veterinary Journal* 18, 342-343
- WILLIS, R. A. & RUDDUCK, H. B. (1943) Testicular teratoma in horses. *Journal of Pathology and Bacteriology* 55, 165-171
- WILLIS, R. A. (1938) A teratoma of a horse's testis. *Journal of Pathology and Bacteriology* 46, 198-200
- WILLIS, R. A. (1962) Teratomas. In *The Borderland Between Embryology and Pathology*, 2nd edn. Ed R. A. Willis. London, Butterworth, pp 442-462

Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations

O. L. GUTIERREZ, L. H. SUMANO, Q. M. ZAMORA

ENROFLOXACIN is currently the most potent antibacterial drug used in poultry medicine. It has become the drug of choice to treat outbreaks of various bacterial diseases in many countries, for example, chronic complicated respiratory disease, mycoplasmosis, and so on. Overuse of enrofloxacin may result in resistant populations of bacteria and may also reduce its clinical efficacy. There have been warnings of the emergence of resistant strains of important pathogens worldwide (Brown 1996, Aarestrup and others 1997). In countries where many brands of enrofloxacin are readily available, the drug is overused and the bioequivalence of some marketed prod-

Veterinary Record (2002) 150, 350-353

O. L. Gutierrez,
L. H. Sumano,
Department of
Physiology and
Pharmacology, School of
Veterinary Medicine,
National Autonomous
University of Mexico,
Mexico City 04510,
Mexico
Q. M. Zamora, PiSA
Agropecuaria SA de CV,
Avenue Miguel Angel de
Quevedo, No 555,
Colonia Romero de
Terralera, Mexico City,
Mexico

Correspondence to
Dr Sumano

Fig. 1: Mean (sd) serum activity/concentrations of enrofloxacin ($\mu\text{g/ml}$) after administration of a single bolus of enrofloxacin and capsaicin (10 mg/kg and 20 $\mu\text{g/kg}$, respectively) (group EC), or the same dose of enrofloxacin (group E)

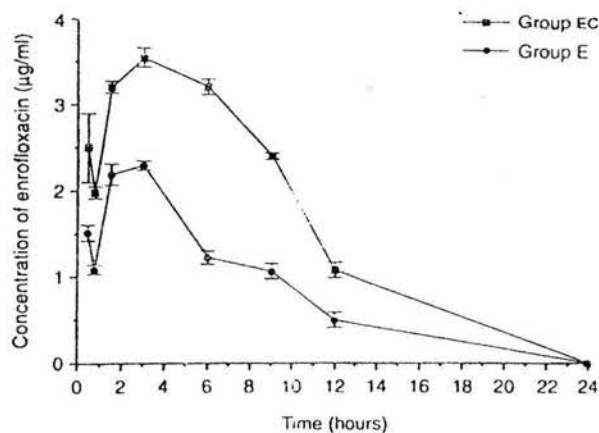


TABLE 1: Pharmacokinetic variables of the serum activity/concentrations of enrofloxacin ($\mu\text{g/ml}$) after administration of a single bolus of 10 mg/kg enrofloxacin and 20 $\mu\text{g/kg}$ capsaicin (group EC), or the same dose of enrofloxacin (group E)

Variable	EC	Group E	P
β_2 (min^{-1})*	0.169	0.11	>0.10
$T_{1/2\beta}$ (hours)	4.10	6.3	0.05
$C_{\text{max}1}$ ($\mu\text{g/ml}$)	2.5	1.51	0.001
$T_{\text{max}1}$ (hours)	0.41	0.41	>0.10
$C_{\text{max}2}$ ($\mu\text{g/ml}$)	3.55	2.29	0.001
$T_{\text{max}2}$ (hours)	3.0	3.0	>0.10
AUC ($\mu\text{g/h/ml}$)	38.029	19.05	0.001

* Second elimination phase

$T_{1/2\beta}$ Half-life of the elimination phase

$C_{\text{max}1}$, $C_{\text{max}2}$ Maximum serum concentrations

$T_{\text{max}1}$, $T_{\text{max}2}$ Time taken to achieve maximum serum concentrations

AUC Area under curve β_2

effects is questionable (Sumano 1993, Sumano and others 1994, Sumano and Ocampo 1995, Sumano and Gutierrez 2000).

To optimise the antibacterial activity expected from enrofloxacin and, consequently, its clinical efficacy, some precautions should be taken. For example, hard water should be avoided as a vehicle (Russel 1992, Sumano 1993), water pipes should be cleaned before dosing, galvanised water tanks should be replaced, and medicated water should not be exposed to direct light (Dorrestein and Van Miert 1988, Wages 1997). Restricting the amount of drinking water for approximately half to one hour ensures rapid consumption of the set dose of the antibacterial. Ideally, dispenser machines should be used to ensure that a diseased flock consumes the estimated dose. Alternatively, daily water consumption during actual medication time in the diseased flock should be estimated to calculate the amount of drug to be added to the water tank (Dorrestein and Van Miert 1988, Sumano and Gutierrez 2001). Application of these practices will ensure that enrofloxacin is being administered as a bolus and, therefore, a higher serum peak concentration (C_{max}) of enrofloxacin can be obtained (Sumano and Gutierrez 2000, 2001). For enrofloxacin, a high C_{max} is more important for the clinical outcome than extended residence time of the drug (Puyt 1995, Brown 1996, Riviere 1999).

Some studies have found that capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-enamide) is capable of enhancing drug absorption. For example, 50 $\mu\text{l/cm}^2$ of a 3 per cent capsaicin-ethanol preparation, caused a four-fold increase in permeation of naproxen through the skin (Degim and others 1999). However, it is not clear how this enhanced absorption occurred. It is thought that capsaicin molecules insert themselves within the cell membrane at the level of the lipid bilayer, disrupting membrane channels and, consequently, selective permeability functions (Hashimoto and others 1997). It is also not known whether enhanced absorption applies to other drugs and to other routes of administration. The aim of this study was to determine whether the administration of a combined form of enrofloxacin and capsaicin was capable of achieving a higher maximal serum concentration of enrofloxacin, than the peak concentration obtained with enrofloxacin alone.

The study was carried out at the experimental poultry farm of the Veterinary College, National Autonomous University of Mexico, Mexico City. One hundred and forty-four clinically healthy Arbor-Across broilers weighing approximately 750 g were used; they had not received any antibacterial medication. The birds were randomly divided into two groups of 25 animals. One group (group EC) received a 0.1 per cent preparation of enrofloxacin (Pyrolox 10 per cent; PISA Agropecuaria) in water, in order to achieve a dose of 10 mg/kg. To this preparation, 2 mg/litre capsaicin (Sigma-Aldrich) was added to achieve a dose of approximately 20 $\mu\text{g/kg}$; the other group (group E) received the same preparation of enrofloxacin alone

(10 mg/kg). To minimise variations in absorption patterns between birds due to enrofloxacin-feed interactions (Radandt and others 1992), they were fasted for six hours before dosing. Each chicken was individually weighed, and then received a single oral bolus dose of the drugs. A total volume of approximately 5 to 10 ml/chicken, was administered using semi-rigid tubing to deliver the drugs directly into the proventriculus. Five technicians were on hand, to ensure a short time interval between administration of the drug and blood sampling from the wing vein. Thus, differences from pre-established times to obtain blood samples to actual sampling times were never longer than two minutes. Blood samples were taken from three birds per group per time at 25 and 45 minutes, and one-and-a-half, three, six, nine, 12 and 24 hours, with only one sample taken from each chicken overall. The blood samples were immediately centrifuged and the serum was recovered, labelled and stored at -10°C until analysed. Thus, nine samples per time for each treatment were obtained.

Determination of the concentration of enrofloxacin in serum was carried out using the quantitative microbiological agar diffusion analysis described by Bennet and others (1966), with *Escherichia coli* ATCC 25922 as the test microorganism. Drug-free chicken serum containing known quantities of enrofloxacin or enrofloxacin and capsaicin were used to obtain a standard curve. A linear regression between 0.08 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$, with a per cent recovery of 94 (2.5) and an intra-assay error less than 5 per cent, was obtained. Capsaicin did not modify these values when added to the serum in 0.001 to 0.02 $\mu\text{g/ml}$ quantities, and its antibacterial contribution, if any, was disregarded.

Because the measured concentrations represent antibacterially active fluoroquinolone, a mixed enrofloxacin and active metabolite pharmacokinetic profile was obtained. Thus, it was decided to analyse the results with a non-compartmental analysis using the trapezoidal method to calculate the area under the curve (AUC). Additionally, the elimination hybrid rate constant (β), the half-life of the elimination phase ($T_{1/2\beta}$), maximum serum concentrations ($C_{\text{max}1}$ and $C_{\text{max}2}$) and times to C_{max} ($T_{\text{max}1}$ and $T_{\text{max}2}$) were calculated from the serum concentrations v time data using spreadsheets (Excel; Microsoft).

Mean values of serum concentrations of enrofloxacin from the groups were compared with a non-parametric Kruskal-Wallis test, using a software package JMP Statistic Mode Visual 1989-1995, Version 3.1.6.2, SAS Institute. As these data showed a non-normal distribution, individual pharmacokinetic values were compared using Dunn tests after the Kruskal-Wallis analysis.

Fig 1 shows the mean (sd) serum concentrations/activities obtained for enrofloxacin and active metabolite in both groups. Table 1 shows derived pharmacokinetic variables.

Two C_{max} values were obtained for both groups, and in both, the C_{max2} values were higher than the corresponding C_{max1} values (177.5 per cent for group EC and 154.6 per cent for group E). Comparison of the mean C_{max1} from group EC and C_{max1} from group E showed an increase of 161.5 per cent for group EC ($P < 0.05$). C_{max2} showed an increase of 151.1 per cent in group EC (2.4 µg/ml in group E to 3.6 µg/ml in group EC) ($P < 0.05$). Table 1 also summarises statistical comparisons between the groups, and shows a clear tendency of group EC to have a higher AUC, C_{max1} and C_{max2} than group E.

The quantitative bacteriological analytical method described by Bennet and others (1966), was used to determine serum concentrations of enrofloxacin due to its reliability compared with high pressure liquid chromatography (Küng and others 1983). This method also provides more meaningful results when relating pharmacokinetic variables to bacteriological activity and clinical outcomes.

The aim of this study was to determine whether a higher C_{max} could be achieved more quickly by adding capsaicin to an enrofloxacin preparation and this can be regarded as true as far as achieving higher C_{max} values. Capsaicin does not possess antibacterial activity of its own and, due to the fact that it is almost completely metabolised before reaching the general circulation (Donnerer and others 1990), high C_{max} values in group EC suggest that absorption of enrofloxacin was enhanced by capsaicin. Increments in C_{max} of enrofloxacin ranged from 164.5 per cent for C_{max1} to 151.1 per cent for C_{max2} . However, the corresponding T_{max1} and T_{max2} values were not altered. This may be due to the fast absorption of enrofloxacin coupled with an insufficient number of blood samplings shortly after placing the drug in the proventriculus. Also, β_1 , $T_{1/2\beta}$, AUC and C_{max} were statistically different between groups, indicating increased absorption and bioavailability in group EC. The double peak shape of the graph obtained for both preparations used, is considered to be the result of enterohepatic cycling of the drug, a feature not described in other studies (Sumano and Gutierrez 2000). Methodological differences between this study and others may be partly responsible for this unique serum profile of enrofloxacin, that is, the direct delivery of the total individual dose of each drug preparation into the proventriculus.

Other trials have shown that capsaicin is capable of enhancing the absorption of drugs, for example, it increased in vitro and in vivo absorption of naproxen through excised human skin and perfused rabbit ear skin four-fold (Degim and others 1999), and it augmented the bioavailability of theophylline capsules when they were given concurrently with a ground capsicum fruit suspension (Bouraoui and others 1988). The manner in which these phenomena occur is unclear, but an increased blood perfusion at the absorption site (intestinal pilli) due to the well-known irritational effects of capsaicin (Magnusson and Koskinen 2000) could partly account for this effect. Also, it has been reported that capsaicin promotes gastric emptying (Kalogeris and others 1997). It has been shown that enrofloxacin can exist in four possible forms: as an acidic cation, a neutral non-ionised species, an intermediate zwitterion and a basic ion, depending on the given pH. At low pH, both the 7-piperazinyl group and the 3-carboxyl group are protonated. At a neutral pH and pH as high as 12, neither group is protonated (Lizondo and others 1997). Hence, when capsaicin passes from the stomach to an alkaline environment within the small intestine, drug dissociation is reduced and absorption facilitated. In contrast, there is evidence that capsaicin reduces intestinal absorption of amino acids in rats, mediated by the release of peptides and neurotransmitters from capsaicin-sensitive primary afferent fibres at this level (Nassar and others 1995).

Enrofloxacin has been recommended for outbreaks of various diseases, such as chronic respiratory disease complicated with *E. coli*, outbreaks caused by *Pasteurella* species,

Haemophilus gallinarum and *Mycoplasma* species. For these purposes, a higher dose (10 mg/kg/day) is usually chosen and, with it, a higher C_{max} value expected. Although the clinical significance of adding capsaicin to the formulation of enrofloxacin awaits investigations of field outbreaks, the fact that the effect of enrofloxacin is more dependent upon reaching a higher peak concentration than upon a long residence time (Puyt 1995, Brown 1996, Riviere 1999, Sumano and Gutierrez 2000) allows the speculation that higher C_{max} values could result in better clinical outcomes. Additionally, it is important to emphasise that bioavailability, in terms of comparative AUC, was double in group EC, compared with group E. The total dose of enrofloxacin was the same in both groups and the cost of capsaicin can be regarded as negligible, so the total cost of medication would not be increased greatly if used in clinical practice.

Considering that the optimal bactericidal concentration of enrofloxacin is usually twice the value of the minimal inhibitory concentration (Sumano 1993, Brown 1996), and if the argument that an increased clinical efficacy is dependent on a higher C_{max} of sustainable enrofloxacin, the drug interaction described here could reduce the rate of appearance of bacterial resistance and perhaps lengthen the useful life-span of enrofloxacin for clinical use.

ACKNOWLEDGEMENTS

Preparations of enrofloxacin and enrofloxacin standard were kindly donated by PISA Agropecuaria Pharmaceuticals, Mexico.

References

- AARESTRUP, F. M., NIELSEN, E. M., MADSEN, M. & ENGBERG, J. (1997) Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* species from human, pigs, cattle and broilers in Denmark. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2244-2250
- BENNETT, J. B., BRODIE, J. L., BENNER, E. J. & KIRBY, W. M. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. *American Society of Microbiology* 14, 170-177
- BOURAOUI, A., TOUNI, A., MUSTAPHA, H. B. & BRAZIER, J. L. (1988) Effects of capsicum fruit on theophylline absorption and bioavailability in rabbits. *Drug-Nutrient Interactions* 5, 345-350
- BROWN, S. A. (1996) Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 19, 1-14
- DEGIM, I. T., ZULU, A., HADGRAFT, J., ATAY, T., AKAY, C. & CEVHEROGLU, S. (1999) The effects of azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. *International Journal of Pharmaceutics* 179, 21-25
- DONNERER, J., AMANN, R., SCHULIGOI, R. & LEMBECK, F. (1990) Absorption and metabolism of capsaicinoids following intragastric administration in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmacologie* 342, 357-361
- DORRESTEIN, D. J. & VAN MIERT, A. S. (1988) Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 11, 33-44
- HASHIMOTO, K., KAWAGISHI, H., NAKAYAMA, T. & SHIMITSU, M. (1997) Effect of capsaicin, a diterpene glycoside, on tight-junctional permeability. *Biochimica et Biophysica Acta* 1323, 281-290
- KALOGERIS, T. J., MONROE, F. & TSO, P. (1997) Stimulation of intestinal apolipoprotein A-IV lipid is independent of capsaicin-sensitive afferent signals. *American Journal of Physiology* 273, R981-R990
- KÜNG, K. L., RIONO, I., WOLFFRAM, S. & WANNER, H. (1983) Comparison of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Research in Veterinary Science* 54, 247-248
- LIZONDO, M., PONS, M., GALLARDO, M. & ESTELRICH, J. (1997) Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15, 1845-1849
- MAGNUSSON, B. M. & KOSKINEN, L. D. (2000) In vitro percutaneous penetration of topically applied capsaicin in relation to in vivo sensation responses. *International Journal of Pharmacology* 195, 55-62
- NASSAR, C. F., BARADA, K. A., ABDALLAH, I. E., HAMIDAN, W. S., TAHA, A. M., ATWEH, S. F. & SAADE, N. E. (1995) Involvement of capsaicin-sensitive primary afferent fibers in regulation of jejunal alanin absorption.

- American Journal of Physiology* 268, G695-G699
- PUYT, J. D. (1995) Antibiotherapie en elevage de volaille. *Bulletin des GTV* 5, 17-109
- RADANDT, J. M., RANDALL, M. C. & DUDLEY, M. N. (1992) Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanism, variability, clinical significance, and management. *Clinical Infectious Diseases* 14, 272-284
- RIVIERE, J. E. (1999) Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques and Applications. Ames, Iowa State University Press. pp 39-45
- RUSSEL, I. D. (1992) Proper water medication with good water systems. *Poultry Digest* 40, 48-52
- SUMANO, L. H. (1993) Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria Mexico* 2, 23-34
- SUMANO, L. H., GRACIA, M. I., ROMERO, V. & RUIZ-RAMIREZ, L. (1994) 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, 63-69
- SUMANO, L. H. & GUTIERREZ, O. L. (2001) Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher serum concentrations. Proceedings of the Fiftieth Western Poultry Disease Conference. University of California, Davis, USA, March 24 to 25
- SUMANO, L. H. & OCAMPO, C. L. (1995) Compositional analysis surveillance of eleven trade brands of enrofloxacin including Baytril, for veterinary use. *Journal of Veterinary Medicine* 42, 669-673
- WAGES, D. P. (1997) Proper medication procedures. *Poultry Digest* 56, 18-19

Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry

L. H. SUMANO
O. L. GUTIÉRREZ &
M. A. ZAMORA

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

Sumano, L. H., Gutiérrez, O. L., Zamora, M. A. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 24, 309–313.

In various parts of the world, many 10% enrofloxacin commercial preparations for water medication of chicken are being employed. To avoid the development of bacterial resistance to this agent, the original trademark and similar preparations must be bioequivalent. To assess whether or not bioequivalence exists among the pioneer vs. three commercial preparations of enrofloxacin, a controlled pharmacokinetic study was conducted. The following variables were compared: maximal plasma concentration (C_{peak}), time to C_{peak} , bioavailability (expressed as the area under the concentration vs. time curve), elimination half-life, and the shapes of the respective time-serum concentrations of enrofloxacin profiles. Results indicate that all three similar commercial preparations had lower C_{peak} values than the reference formulation, being 39.62 to 67.77% of the corresponding C_{peak} reference. Additionally, bioavailability of enrofloxacin in the pioneer product was statistically higher ($P < 0.05$). Based upon these results, we conclude that although all preparations were formulated as water-soluble products, bioequivalence studies are mandatory for the analogue formulations to ensure product comparability. Lack of product bioequivalence could facilitate the development of bacterial resistance and limit the useful life span of the product.

(Paper received 1 November 2000; accepted for publication 21 June 2001)

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

INTRODUCTION

Despite the US delay in approving the use of enrofloxacin (1-cyclopropyl-7-(4 ethyl-1-piperazinyl)-6 fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid) to treat specific bacterial outbreaks in poultry, the original preparation of enrofloxacin, and many generic preparations, have been available in Latin America for almost two decades. In many countries, the fear of bacterial resistance has limited the avian use of enrofloxacin. In contrast, economic pressures on chicken meat production in Latin America have prompted an excessive use of enrofloxacin containing products. Hence, in Latin America this antibacterial agent has become the drug of choice for almost any bacterial problem, used not only in outbreaks of bacterial diseases but also in questionable metaphylactic strategies. This includes its use during preventive maneuvers when nearby poultry houses are exhibiting signs of bacterial infections.

Pharmacokinetic variables for the original preparations of enrofloxacin have already been studied by various authors (Abd-el-aziz *et al.*, 1997; Anadón *et al.*, 1995; Garcia-Ovando *et al.*, 1999; Knoll *et al.*, 1999). Table 1 summarizes the corresponding information. Although methodological differences in their work may limit straightforward comparisons differences in their results are seemingly unimportant, particularly because most of these studies used the same source of enrofloxacin, i.e.

the original preparation. However, if different sources of enrofloxacin are compared, it may be reasonable to postulate that some differences may occur, particularly if different vehicles are utilized (Sumano *et al.*, 1994; Sumano & Ocampo, 1995). Because changes in pharmacokinetic variables may modify withdrawal times and could negatively impact clinical outcomes, it was regarded as important to determine whether or not four commercial preparations of enrofloxacin were bioequivalent.

MATERIALS AND METHODS

The pharmacokinetic analysis of four commercial preparations of enrofloxacin was carried out at the experimental poultry farm of the Veterinary College, National Autonomous University of Mexico. Two hundred and forty clinically healthy Arbor-Across broilers, weighing approximately 750 ± 12 g, were used. They had not been previously exposed to any antibacterial agent. Animals were randomly divided into four groups of 60 animals each. In each group the repetitions were made, including 20 birds per repetition obtaining in the end three separate plasma vs. time relationship. To minimize absorption variability because of enrofloxacin–feed interactions (Radandt *et al.*, 1992), animals were fasted for 6 h before dosing, and water was withdrawn 1 h prior to the drug administration. Later they had immediate

Table 1. Pharmacokinetic variables for enrofloxacin in poultry, studied by various authors

Variable	Abd-el Aziz et al. (1987)*			García-Ovando et al. (1999)†			Anadón et al. (1990, 1995)†			Knoll et al. (1999)†		
	i.v.	i.m.	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.	i.v.	Oral	p.o.	p.o.	i.v.	
Dose (mg/kg)	10	10	2.5	5	10	10	10	10	10	10	10	
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	25.67 \pm 1.47	22.46 \pm 0.44	16.60 \pm 0.55	*	*	*	34.5 \pm 1.30	*	14.42	16.17	*	
β (/h)	0.019 \pm 0.0004	0.16 \pm 0.002	0.016 \pm 0.003	*	*	*	0.068 \pm 0.006	0.049 \pm 0.002	*	*	*	
$T_{1/2}$ β (h)	3.65 \pm 0.08	4.06 \pm 0.057	4.29 \pm 0.097	0.4	0.4	0.4	10.29 \pm 0.045	14.23 \pm 0.46	1.20	1.20	*	
Cp_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	*	2.45 \pm 0.104	1.69 \pm 0.082	0.6	1.4	1.4	*	2.44 \pm 0.06	1.88	1.88	*	
T_{max} (h)	*	1.43 \pm 0.021	2.52 \pm 0.075	*	*	*	*	1.64 \pm 0.04	1.5	1.5	*	

*Assay using Spectram Vet[®] Egypt. †Assays using Baytril[®] Bayer.

β = hybrid rate constant for terminal elimination phase, $T_{1/2}\beta$ = half-life at β phase (post-distribution), AUC = area under the concentration time curve, Cp_{max} = maximal concentration in plasma (serum) after oral administration, T_{max} = time needed to reach Cp_{max} .

access to water and they were given food after 2 h from the administration of enrofloxacin. Each chicken was individually weighed and then received a single oral bolus dose of enrofloxacin by means of a semirigid tubing. The dose of 10 mg/kg of a 0.1% solution [10 mL of the commercial preparation diluted in 1 L of tap water with international quality standards (Russel, 1992)] was directly placed into the proventriculus in a total volume of approximately 7.5 mL per chicken as measured with a 10-mL syringe. Animals were observed for 10–20 min and only few birds regurgitated the medication; they were not included in the trial. Because of lack of certainty in the quality of many preparations of enrofloxacin in Latin America, identity of the four preparations of 10% enrofloxacin was carried out and confirmed as previously described (Sumano et al., 1994; Sumano & Ocampo, 1995). Dosing groups were defined as follows: groups 1 and 2 were medicated with the most inexpensive brands available; group 3 was medicated with a commercial preparation having a higher price (permission to reveal sources was not granted); and group 4 received the original brand of enrofloxacin (Bayer de México, Mexico City, Mexico). To achieve a close timing interval between administration of the drug and blood sampling from the wing vein, assistance from 10 technicians and clock-watch timing was ensured. Thus, differences between the targeted and the actual blood sampling times were never longer than 2 min. Approximately 1.5–2.0 mL blood samples were taken from three birds per time at 25 and 45 min, 1.5, 3, 6, 9, 12 and 24 h in three separate trials. One, and occasionally two samples were taken from each chicken, being timed as far apart as possible. Blood samples were immediately centrifuged, approximately 0.6 mL of serum recovered, identified and frozen until analysed.

Determination of enrofloxacin on each sample of serum was carried out in triplicates using the quantitative/qualitative microbiological agar diffusion analysis, described by Bennet et al. (1966), using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the test micro-organism and 0.1 mL chicken serum as case sample. A reference linear regression between 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (regarded as limit of detection) and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with a percent recovery of 94 \pm 2.5 and intra-assay error smaller than 5%, was achieved.

Because the drug quantified was not only the parent compound (enrofloxacin), but also were other active metabolites present thus giving a confounding pharmacokinetic profile, a non-compartmental analysis was carried out using the trapezoidal method to calculate the area under the curve (AUC). Half-life of the elimination phase (β), value of β , maximum plasma concentrations ($\text{C}_{\text{peak}1}$ and $\text{C}_{\text{peak}2}$) and times to C_{peak} ($T_{\text{max}1}$ and $T_{\text{max}2}$) were calculated from the serum concentrations vs. time graphs using Microsoft Excel.

RESULTS

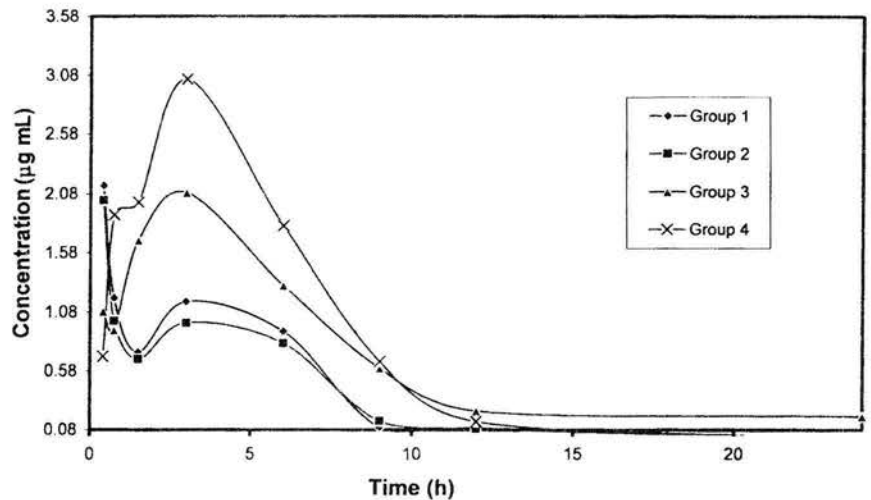
Table 2 lists the mean of the means \pm 1 SD of the three different repetitions of serum concentration/activity of enrofloxacin in time of the three trials per group and of the four commercial preparations of enrofloxacin. Figure 1 shows the profiles of the

Table 2. Serum concentrations of enrofloxacin in poultry medicated with three generic preparations of enrofloxacin and the reference preparation (Baytril®). Each value is the mean \pm 1 SD of three trials

Time (h)	Group 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Group 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Group 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Group 4 ($\mu\text{g/mL}$)
0.41	2.15 \pm 0.17 (3, 4)	2.03 \pm 0.27 (3, 4)	1.08 \pm 0.25 (1, 2, 4)	0.70 \pm 0.36 (1, 2, 3)
0.75	1.20 \pm 0.08 (3, 4)	1.01 \pm 0.20 (3, 4)	0.93 \pm 0.27 (1, 2, 4)	1.90 \pm 0.57 (1, 2, 3)
1.5	0.74 \pm 0.04 (3, 4)	0.68 \pm 0.04 (3, 4)	1.68 \pm 0.10 (1, 2, 4)	2.01 \pm 0.25 (1, 2, 3)
3	1.17 \pm 0.13 (3, 4)	0.99 \pm 0.18 (3, 4)	2.09 \pm 0.19 (1, 2, 4)	3.05 \pm 0.36 (1, 2, 3)
6	0.92 \pm 0.03 (3, 4)	0.81 \pm 0.06 (3, 4)	1.31 \pm 0.06 (1, 2, 4)	1.81 \pm 0.39 (1, 2, 3)
9	0.10 \pm 0.03 (3, 4)	0.15 \pm 0.05 (3, 4)	0.60 \pm 0.09 (1, 2)	0.66 \pm 0.10 (1, 2)
12	0.10 \pm 0.02 (3, 4)	0.09 \pm 0.04 (3, 4)	0.24 \pm 0.07 (1, 2, 4)	0.15 \pm 0.06 (1, 2, 3)
24	0.00 (3)	0.00 (3)	0.19 \pm 0.05 (1, 2, 4)	0.00 (3)

Number(s) within parentheses is (are) the group(s) for which each value is different.

Fig. 1. Mean serum concentration/activities vs. time relationships of three generic preparations of enrofloxacin (groups 1, 2, 3) and the reference enrofloxacin preparation (group 4) in chicken. All preparations were administered orally at a dose of 10 mg/kg through a canula directly into the proventriculus.



concentration/activity of enrofloxacin and active metabolites, where five data points were used to calculate the final phase of the time-concentration curve. Table 3 lists the relevant pharmacokinetic values derived from non-compartmental analysis of the data.

Using ANOVA, it was found that mean values of serum concentration/activity of enrofloxacin and active metabolites did not follow a normal distribution; but did appear to be Ln-normally distributed. Data were processed in all groups using a non-parametric Kruskal-Wallis analysis, through the software package JMP (JMP Statistic Mode Visual 1989-95, SAS Institute Inc., Version 3.1.6.2, SAS Campus Drive Cary, NC, USA). When all data from all 12 concentration/activity vs. time profiles were compared, no statistically significant differences could be observed. However, there were statistically significant differences among the serum concentration/activities at some individual times. Pharmacokinetic values that were statistically different

are marked in Table 3. Basically, statistical analysis shows that group 4 possesses different pharmacokinetic variables when compared with all other three groups, which are almost similar among them. The reference enrofloxacin showed the greatest C_{peak} and AUC values. Ratios between C_{peak} and AUC from generic preparations to the corresponding reference values are shown in Table 4. Also, a noticeable difference observed was the shape of serum concentration of enrofloxacin vs. time relationship in all three generic preparation groups as compared with the corresponding one determined for the reference enrofloxacin group (see Fig. 1). The former group's data showed a double peak shape curve, while a single peak curve was obtained for group 4. All $T_{\text{max}1}$ values were not different among the three generic preparations. If the only T_{max} from the reference enrofloxacin preparation is compared with $T_{\text{max}2}$ from the other three preparations, lack of comparability among them was observed, with values ranging from 3.0 to 5.5 h.

Variable	Group 1 X ± SD	Group 2 X ± SD	Group 3 X ± SD	Group 4 X ± SD
β (/h)	0.22 ± 0.003 (4)	0.22 ± 0.002 (4)	0.23 ± 0.008 (4)	0.38 ± 0.004 (1, 2, 3)
$T_{1/2\beta}$ (/h)	3.15 ± 0.03 (4)	3.15 ± 0.04 (4)	3.01 ± 0.03 (4)	1.82 ± 0.03 (1, 2, 3)
C_{peak1} (µg/mL)	2.15 ± 0.02 (4)	2.03 ± 0.01 (4)	1.09 ± 0.03 (4)	3.05 ± 0.02 [†] (1, 2, 3)
C_{peak2} (µg/mL)	1.17 ± 0.01 (4)	0.99 ± 0.01 (4)	2.08 ± 0.01 (1, 2, 4)	
AUC (µg/mL/h)*	8.26 ± 0.03 (4)	7.46 ± 0.02 (4)	15.96 ± 0.03 (1, 2)	18.78 ± 0.02 (1, 2)
T_{max1} (h)	0.7 ± 0.08 (4)	0.5 ± 0.04 (4)	0.5 ± 0.02 (4)	5.5 ± 0.06 (1, 2, 3) [‡]
T_{max2} (h)	4.5 ± 0.03 (3)	5.0 ± 0.06 (3)	3.0 ± 0.06 (3)	

*Using the mathematical-trapezoidal method, [†]Comparing the only C_{peak} and T_{max} of group 4 against the C_{peak2} and T_{max2} of the three generic preparations, [‡]Comparing T_{max1} of groups 1, 2, 3 vs. the only T_{max} in group 4. Number(s) within parentheses is (are) the group(s) for which each value is different.

Table 4. Ratios row/column for AUC from the four preparations of enrofloxacin and ratios row/column for $C_{p_{max1}}$ derived from each of the three commercial preparations and the only $C_{p_{max}}$ found for the reference enrofloxacin (Baytril[®], Bayer)

Group	1	2	3	4
AUC				
1	1.00			
2	1.11	1.00		
3	0.52	0.47	1.00	
4	0.44	0.40	0.85	1.00
$C_{p_{max}}$				
1	1.00			
2	1.06	1.00		
3	1.03	0.97	1.00	
4	0.70	0.67	0.69	1.00

DISCUSSION

It has been stated that bioequivalent drug products are generally statistically indistinguishable based on their respective concentration–time profiles for the active drug moiety in the appropriate biological matrix (Riviere, 1994). Considering this definition, the preparations tested in this trial are not bioequivalent. The microbiological method used to quantify enrofloxacin and its active metabolites in serum samples has been described to be as precise as an analysis using high performance liquid chromatography (HPLC) (Küng *et al.*, 1983) furthermore, because it evaluates the bioactive form(s) of a drug, it can give more meaningful clinical applications of the pharmacokinetic variables determined. However, this microbiological method does not differentiate between the antimicrobial activity associated with a parent compound or its metabolites or even other microbial growth inhibitors that could be present in a given formulation. More specific (HPLC)

Table 3. Pharmacokinetic variables obtained for four commercial preparations of enrofloxacin in poultry after a single bolus dose of 10 mg/kg orally. Different letters mean differences statistically significant ($P < 0.05$)

methods do not report a T_{max} for enrofloxacin in poultry until at least 1.5 h (Knoll *et al.*, 1999), which is substantially later than the 0.5–0.7 h, associated with T_{max1} for groups 1, 2 and 3 in this study. Differences may be because of the manner in which enrofloxacin was directly delivered into the proventriculus in a food-free cavity in this study, thus favoring absorption. The manner in which the dose of enrofloxacin was given in other studies is not fully clarified. Timing of the second peak in groups 1–3 occurs in close agreement with reported values; thus T_{max} for all enrofloxacin preparations including the reference one (approximately 3.0 h) are in close agreement with other reported values, i.e. $T_{max} = 2.52$ h (Abd-el-Aziz, 1997).

Considering the lack of equivalence in the shapes of the concentration/activity vs. time relationships found for groups 1–3 with the reference enrofloxacin, there are several mechanisms by which the multiple peaks may occur. In part it may be attributable to delayed appearance of the active metabolite, ciprofloxacin, it may also be that enrofloxacin is actively secreted into the intestinal mucosa, and therefore it can be re-absorbed. Riviere (1999), regards that the cardinal sign for enterohepatic recycling is a 'hump' or a double peak shape of the serum concentration/activities-time profiles. In a study with ofloxacin, also a fluoroquinolone, in human beings, double-peak was interpreted as either enterohepatic circulation or biphasic gastric emptying of ofloxacin (Orlando *et al.*, 1992). These observations are in agreement with findings in rats for an experimental fluoroquinolone where the amount of enterohepatic circulation reached 59.8% of the fraction excreted in bile (Saito *et al.*, 1988). However this study cannot differentiate between the parent from and the active metabolite(s) activities; therefore it is only safe to say that the generic preparations tested are bioinequivalent. The consequences of these differences may impact on the withdrawal times and clinical efficacy of enrofloxacin is more dependant upon reaching a high C_{peak} value than upon

its time duration above a minimal inhibitory concentration (Prescott, 1980; Anne *et al.*, 1993). In this respect, similar pharmaceutical preparations of enrofloxacin seeking approval to enter the market should demonstrate their ability to achieve C_{peak} values equivalent to that of the original preparation. A low C_{peak} can be detrimental to product and may encourage the proliferation of resistant micro-organisms. Moreover cautious drug use is essential, including, avoiding problems associated with drug administration in hard waters, underdosing, or administered without previous water deprivation of the affected flock for 30–40 min to increased thirst (Puyt, 1995; Wages, 1997).

In this study, the original preparation of enrofloxacin had the highest bioavailability, as measured by the value of the AUC. The AUC from group 4 was statistically superior ($P < 0.05$) to the AUC values for groups 1 and 2; although it was not statistically greater than that of group 3. Diminished absorption, caused by inadequate vehicles, could have contributed to limit AUC in groups 1 and 2.

This study was carried out with healthy chicken, and under controlled conditions. Under field conditions, the dose of enrofloxacin is not taken as a single bolus and the observed effect may be more apparent. The bioequivalence found in this trial for enrofloxacin may limit the useful life span of one of the most potent antibacterial agents used in veterinary medicine.

REFERENCES

- Abd-el-aziz, M.I., Azis, M.A., Soliman, F.A. & Afify, N.A. (1987) Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *British Poultry Science*, **38**, 164–168.
- Anadón, A., Martínez-Larañaga, M.R., Diaz, J., Velez, C. & Bringas, P. (1990) Pharmacokinetic and residue studies of quinolone compounds and olaquinox in poultry. *Annals Research Veterinary*, **21**, 137–144.
- Anadón, A., Martínez-Larañaga, M.R., Diaz, J., Bringas, P., Martínez, M.A., Fernández-Cruz, M.L. & Fernández, R. (1995) Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, **56**, 501–506.
- Anne, E., Asuquo, J. & Piddock, V. (1993) Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **31**, 865–880.
- Bennet, J.V., Brodie, J.L., Benner, E.J. & Kirby, W.M.M. (1966) Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiology*, **14**, 170–177.
- García-Ovando, H., Gorla, N., Luders, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G. & Puelles, I. (1999) Comparative Pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **22**, 209–212.
- Knoll, U., Glünder, G. & Kietzmann, M. (1999) Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentration of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **22**, 239–246.
- Küng, K.J., Riond, L. & Wanner, M. (1983) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 462–468.
- Orlando, R., Sawadogo, A., Miglioli, P.A., Cappellazzo, M.G. & Palatini, P. (1992) Oral disposition kinetics of ofloxacin in patients with compensated liver cirrhosis. *Chemotherapy*, **38**, 1–6.
- Prescott, J.F. (1980) Antimicrobial susceptibility testing and antimicrobial drug dosage. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **10**, 1085–1090.
- Puyt, J.D. (1995) Antibiotic therapy in poultry production. *Bulletin des Groupements Techniques Veterinaires*, **5**, 17–110.
- Radandt, M.J., Randall, M.C. & Dudley, M.N. (1992) Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management. *Clinical Infectious Diseases*, **14**, 272–284.
- Riviere, J.E. (1994) Unique problems associated with the determination of veterinary drug product bioequivalence. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **17**, 86–88.
- Riviere, J.E. (1999) Comparative pharmacokinetics. *Principles, Techniques and Applications*. Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Russel, I.D. (1992) Proper water medication with good water systems. *Poultry Digest*, **51**, 40–48.
- Saito, A., Nagata, O., Takahara, Y., Okezaki, E., Yamada, T. & Ito, Y. (1988) Enterohepatic circulation of NY-198, a new difluorinated quinolone in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **32**, 156–157.
- Sumano, L.H., Gracia, M.I., Romero, V. & Ruiz-Ramirez, L. (1994) The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. *Veterinary and Human Toxicology*, **5**, 476–477.
- Sumano, L.H. & Ocampo, C.L. (1995) Compositional analysis surveillance of eleven brands of enrofloxacin including Baytril R for veterinary use. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, **42**, 669–673.
- Wages, D.P. (1997) Proper medication procedures. *Poultry Digest*, **56**, 18–19.

10. DISCUSIÓN

Hace ya más de dos décadas que la comunidad científica internacional no ha logrado generar una idea de un antimicrobiano que satisfaga los estándares de organismos regulatorios de países líderes de opinión. Esto ha dado lugar a que no se haya permitido introducir un nuevo antibacteriano para uso en medicina veterinaria en dicho tiempo (88). Aunque cada vez es más difícil generar nuevas opciones antibacterianas para la salud animal, siguen generándose ideas y nuevos enfoques para tratar las enfermedades bacterianas en el ser humano; sin embargo, el costo y el riesgo financiero implícitos en satisfacer todas las demandas regulatorias de organismos como la FDA o la Comunidad Europea, hacen poco probable que en el corto plazo se tengan nuevas opciones antibacterianas disponibles para el clínico veterinario. Por lo anterior resulta necesario hacer uso óptimo de los recursos antibacterianos hasta ahora disponibles. En avicultura se han tomado pasos para racionalizar el uso de antibacterianos, tanto a nivel internacional (42, 30), como en Latinoamérica (30, 89). Sin embargo, es sabido que se abusa del uso de estos agentes en Latinoamérica y que a menudo se cuestiona la calidad (90) amén de que no se realizan estudios de bioequivalencia de los genéricos (53, 91). El uso de los antibacterianos destinados a medicina veterinaria para animales de producción y solo con fines terapéuticos, aunque en México no se tienen datos, se calcula que se consumen aproximadamente 437 toneladas por año en el Reino Unido; adicionalmente se estima un consumo de 24 toneladas de promotores del crecimiento de origen antibacteriano y 150 toneladas de anticoccidianos, principalmente en avicultura. Este último cálculo es aproximado por no tener un control completo de ellos. De las 437 toneladas, 340 se administran por vía oral y de ellas 20 a 25 toneladas corresponden a medicación en el agua de bebida en el caso de la avicultura. México con una producción mayor y por ende con un mayor control consume una cifra mucha mayor. Las consecuencias predecibles y observadas en campo son el aumento de las resistencias bacterianas y la reducción en la eficacia clínica. Las consecuencias menos tangibles, pero quizá más ominosas sean los brotes de enfermedades en el hombre a partir de bacterias zoonóticas resistentes (*Campylobacter* sp, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp.), aunque este último punto sigue siendo materia de debate (11, 48, 69, 70).

Se pudiera pensar que la regulación en la venta y uso de antibacterianos pudiera ser parte de la solución a este problema y se han iniciado muchas acciones al respecto en la Comunidad Europea, Estados Unidos y Canadá, pero en México la regulación al respecto se encuentra en etapa inicial. En la práctica no se cuenta con la infraestructura adecuada para vigilar que se cumplan normas de uso más estrictas y tampoco se ha logrado controlar la importación de principios activos y su uso por los mismos productores. Además, no se cuenta con reglamentaciones que garanticen una calidad homogénea de los productos usados en el país.

Inicialmente se admitía que dos equivalentes químicos o farmacéuticos eran bioequivalentes mientras no se demostrara lo contrario, hoy en día esta premisa no es válida y se admite, en general, que dos equivalentes químicos en cuanto a principio activo no son bioequivalentes mientras no se demuestre lo contrario. Dos preparados farmacéuticos serán bioequivalentes si tienen una misma biodisponibilidad tras la administración de las mismas dosis molares en idénticas condiciones (véase cuadro 12). No siempre es preciso realizar ensayos clínicos de biodisponibilidad y bioequivalencia (BD/BE) para aceptar la bioequivalencia de dos productos con la misma dosis, preparación y principio activo. De hecho, la propia FDA indica que no es factible ni deseable que se realicen estudios de BD/BE para todos los fármacos pues ellos consideran que la vía endovenosa y la intramuscular son virtualmente equivalentes en preparados simples y que demostraron equivalencia química del principio activo. No obstante, en estudios fuera de protocolo de este ensayo, hemos encontrado ausencia de bioequivalencia de preparados sencillos de enrofloxacin por vía intramuscular en bovinos (91) y en cerdos (92) de manera tal que tendría que revisarse este concepto. La FDA si reconoce que son necesarios los estudios de BD/BE en el caso de preparados que se administran por vía oral, en particular aquellos que requieren de disolverse y liberarse para poderse absorberse a través de la pared gastrointestinal. Éste sería el caso de formas sólidas y dispersables, pero de acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo, existen notables diferencias en la absorción de la enrofloxacin a partir de soluciones con la misma concentración del principio activo y con aparentemente la misma actividad biológica *in vitro* (3). Mas aún, las diferencias pueden

ser tan notables que pueden fácilmente considerarse promotoras de la generación de resistencia bacteriana, sobre todo si se toma en cuenta las conclusiones de Baquero y Blázquez (88) quienes postulan que se puede minimizar la selección de mutantes con dosis elevadas de enrofloxacin y que por supuesto alcancen valores de $C_{p_{MAX}}$ lo más alto posible en un T_{MAX} corta. Al respecto se presenta como parte de los hallazgos de este ensayo una propuesta de dosificación utilizando el doble de la concentración de enrofloxacin mediante el sencillo procedimiento de utilizar la mitad del diluyente o agua en el tinaco, lo que genera valores de $C_{p_{MAX}}$ 268 % mayores en un T_{MAX} similar (33). Aunque este resultado podría considerarse predecible dado que la difusión por medio de los canales de porinas es mayor si se tiene una mayor concentración a nivel luminal, se desconoce la magnitud de otras influencias en esta manipulación, por ejemplo la participación de las enzimas luminarias, la activación o no de una mayor actividad de la Pgp, etc. A menudo las predicciones tienen que ser confirmadas experimentalmente en farmacología.

A partir de evidencias de la falta de bioequivalencias en la industria farmacéutica veterinaria en México, se ha propuesto no solamente el seguimiento de esta problemática sino que se ha postulado como línea de investigación pragmática la modificación estratégica de los vehículos de los antibacterianos ya existentes en el mercado (90). Mientras surgen nuevas opciones antibacterianas este enfoque puede contribuir a mejorar las concentraciones plasmáticas y por ende la actividad antibacteriana y la respuesta clínica. Aparte del diseño farmacéutico *per se*, una opción novedosa es la utilización de los denominados promotores de la absorción basados en la inhibición de bombas de eflujo y promoción de las bombas de influjo y otros mecanismos.

La absorción oral de muchos antibacterianos ha sido en la actualidad el foco de innumerables trabajos, en últimas fechas se ha visto que las enzimas que se encuentran en el borde de cepillo de los enterocitos (P-glicoproteína y Citocromo P450) y las bombas de influjo y eflujo poseen una influencia directa sobre la biodisponibilidad oral de muchos fármacos (68, 77). Se ha demostrado que algunos fármacos requieren de promotores de la absorción para superar el obstáculo que representa la barrera epitelial (78, 80-83). La inhibición o activación de transportadores pueden ser ampliamente utilizadas, un ejemplo

histórico está dado por probenecid el cual disminuye la eliminación renal de fluoroquinolonas y β -lactámicos, en la actualidad se sabe que este efecto esta dado, en gran parte, por la participación de bombas OAT y MRP2 (65). Se han observado efectos similares por múltiples bombas para diversos antibacterianos, lo cual abre un campo completamente virgen en el uso de fármacos en veterinaria, encontrando la posibilidad de utilizar acarreadores que aumenten las biodisponibilidades de los fármacos o siendo más ambiciosos aún, bombas que introduzcan específicamente el antibacteriano a la bacteria o que evite que la bacteria lo expulse, con lo cual la problemática actual de resistencias se vería disminuida, y la eficacia clínica aumentada.

La baja biodisponibilidad oral de la enrofloxacin en comparación a su biodisponibilidad IM y SC, abre una oportunidad de convertir a uno de los antibacterianos más potentes usados a la fecha en avicultura en, literalmente, una nueva entidad farmacológica. El reto debe mantener en perspectiva un anclaje pragmático pues se conocen como promotores de la absorción a otros antimicrobianos, antimicóticos, bloqueadores del calcio, etc. El promotor de la absorción ideal debe poseer una baja o nula toxicidad, efecto de acción rápido, bajo o nulo efecto residual y que al ser removido o metabolizado permita la rápida recuperación de la integridad y capacidad enzimática del epitelio GI. Se ha propuesto que la reversibilidad del daño ocasionado en el sitio de absorción por algunos promotores sea la variable más importante a considerar para cualquier promotor de la absorción que se elija. Para elegir un promotor de absorción específico se requiere la completa identificación de los mecanismos de absorción de la enrofloxacin, por ejemplo: la ubicación a lo largo del TGI y la actividad de los transportadores de la enrofloxacin, la ubicación y actividad de las enzimas metabolizadoras, en particular la P450 y la posible presencia de bombas de flujo (68, 94, 95). En la figura 13 se esquematizan los mecanismos fundamentales de regulación de la absorción de la enrofloxacin conocidos a la fecha, incluyendo la participación del equilibrio pKa/pH para las 4 fases de microdisociación de la enrofloxacin.

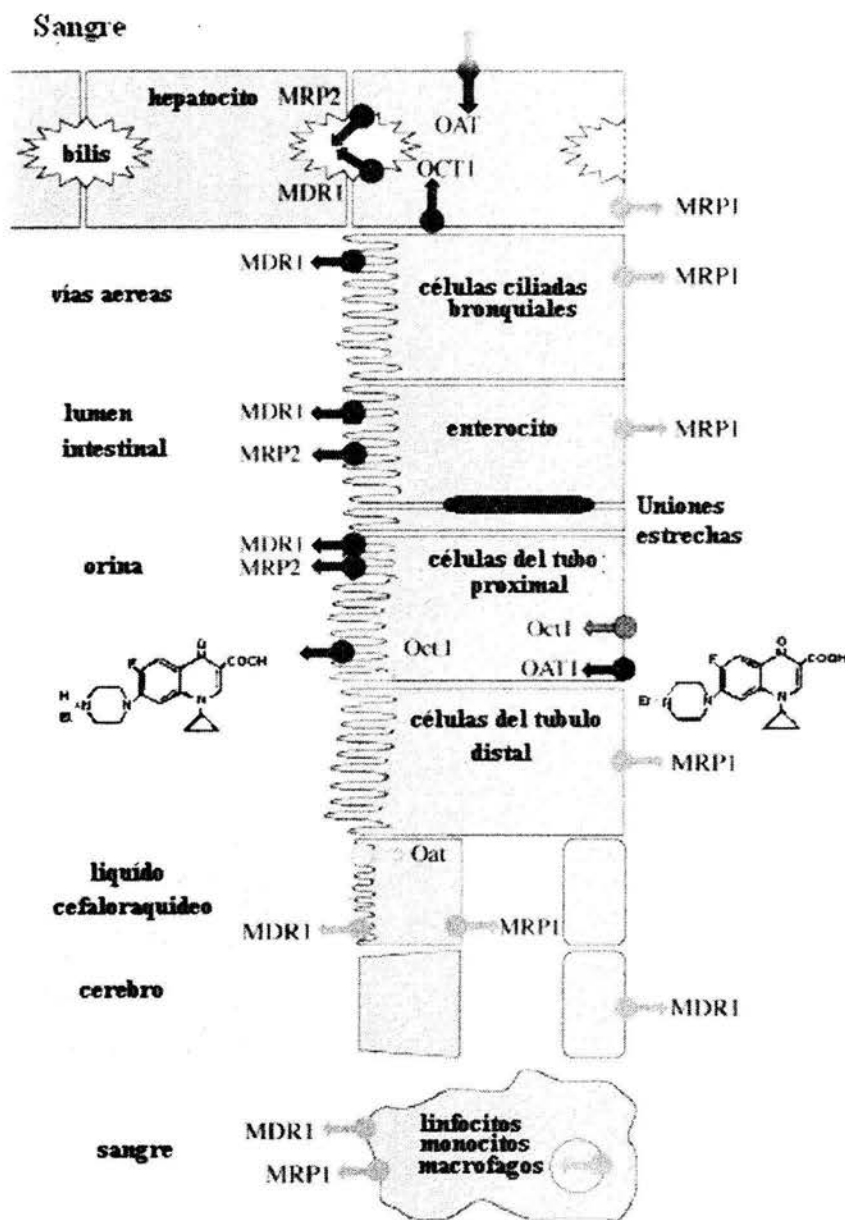


Figura 13. Principales bombas implicadas en la absorción y expulsión de la enrofloxacin

En este trabajo se han presentado los primeros resultados de investigaciones realizados en el campo de la promoción exitosa de la absorción de la enrofloxacin en aves utilizando capsicum, un promotor de la absorción que cumple con los requisitos antes mencionados (96) y los resultados son alentadores amén de que pueden aplicarse en situaciones de campo para mejorar la respuesta clínica. Pero quizá más importante que lo anterior es, como se mencionó anteriormente, el hecho, de que se abre la posibilidad para

la investigación sobre el uso de los promotores de la absorción e inhibidores del metabolismo enzimático intestinal para mejorar las presentaciones farmacéuticas de antimicrobianos no solamente de enrofloxacin para ésta y otras especies, así como para otras vías pues parte de estos fenómenos se repiten a otros niveles v.g. conjuntiva, epitelios capilares, barrera hematoencefálica y obviamente en células procariotas en las cuales la acción conjunta de un promotor de la absorción y un antibacteriano pudieran aumentar la susceptibilidad a concentraciones titulares relativamente bajas de un antibacteriano. El potencial de investigación básica y aplicada es enorme y puede pesar en contra de la ominosa sentencia de Baquero y Blázquez (88) quienes aseguran que existe un peligro inminente de regresar a una era preantibiótica.

11. LITERATURA CITADA

1. Appelbaum, P.C., Hunter, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. *Intern J Antimicrob Ag* 2000; 16:5-15.
2. Eng, G.Y., Maxwell, R.J., Cohen, E., Piotrowski, E.G., Fiddler, W. Determination of flumequine and oxolinic acid in fortified chicken tissue using on-line dialysis and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromat A*. 1998;1-2:349-354.
3. Sumano, L.H., Ocampo, C.L. *Farmacología Veterinaria* 2^a ed. México McGraw Hill/Interamericana, 1997.
4. Ellerbroek, L. Microbiological determination of the quinolone carbonic acid derivatives enrofloxacin, ciprofloxacin and flumequine. *Fleischwirtschaft*. 1991; 2:187-189.
5. Brown, S.A. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Therap*. 1996; 19:1-14
6. Hooper, D.C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infectious Diseases* 2002;2:530-538.
7. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A., Quinolone resistance from a transferable plasmid, *Lancet* 1998; 351:797-799.
8. Caldwell, J. The role of drug metabolism in drug discovery and development: Opportunities to enhance time- add cost-efficiency. *Pharma Science*.1989; 2:117-119.
9. Prescott, J.F. Antimicrobial susceptibility testing and antimicrobial drug dosage. *J Am Vet Med Assoc* 1980;10:1085-1090.
10. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2184–2185
11. Luo, N. Sahin, O. Lin, J. Michel, L. O. Zhang, Q. J In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations a; 47:390-394.
12. Sumano, L.H., Ocampo, C.L. *Farmacología Veterinaria* 2^a ed. México McGraw Hill/Interamericana, 1997.
13. Goodman, G.T., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor P. *Las bases terapéuticas de la farmacología* 8^a ed. México : Panamericana, 1990.
14. Katzung, B.G., *Farmacología Básica y Clínica*. 4^a ed. El Manual Moderno. México, 1993.
15. Sumano, L.H. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Rev. Vet. Mex* 1993;2:24-28
16. Abdel-el-aziz M.I., Asís, M.A., Soliman, F.A., Afify, N.A. Pharmacokinetics evaluation of enrofloxacin in chickens. *British Poultry Science* 1997;38:164-168.
17. Baudity, P. Results of clinical studies with Baytril in poultry. *Vet Med Review* 1987;2:130-1360.
18. Scheer, M. Concentrations of active ingredient in the serum and tissue after oral and parenteral administration of Baytril. *Vet Med Review* 1987;2:104-118.
19. Anadon, A., Martínez, M.R., Díaz, M.J., Bringas, P., Martínez, M.A., Fernández – Cruz M.L., Fernández, M.C., Fernández, R.. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens . *AM J Vet Res* 1995;56:501-506

38. Russel ID. Proper water medication with good water systems. Poultry Digest 1992; 54:40-48
39. Wages DP. Proper medication procedures. Poultry Digest 1997;56:18-19
40. Rodríguez-García R. Evaluación de la mezcla enrofloxacin trimetoprim in vitro. Tesis licenciatura México (D.F.) F.M.V.Z. U.N.A.M. 1997.
41. 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.
42. Dorrestein DJ; Van Miert ASJPAM. Pharmacotherapeutic aspects of medication of birds. J Vet Pharmacol Ther 1988;11:33-44
43. Sumano LH y Caballero ChS. Influencia de los antimicrobianos sobre la respuesta inmune. Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1997 agosto 10-13; Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero).
44. Medders WM, Wooley RE, Gibbs PS, Shotts EB, Broen J. Mutation Rate of avian intestinal coliform bacteria when pressured with fluoroquinolones. Avian Dis 1998;1:146-53
45. Abd el Aziz MI Agag AE. Influence of some antibiotics used as growth promoters on immune response of chickens. Assiut Vet Med J 1996;35:64-75.
46. Schoevers et al. 1999. Effects of Enrofloxacin on Porcine Phagocytic Function. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2138 – 2143)
47. Roche Y. Fay M. Gougerot-Pocidallo MA. Enhancement of interleukin 2 production by quinolone-treated human mononuclear leukocytes. International Journal of Immunopharmacology. 10(2):161-7, 1988.
48. Koenraad, P.M.F.J., Jacobs-Reitsma, W.F., Laan Van Der, T., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. Antibiotic susceptibility of Campylobacter isolates from sewage and poultry abattoir drain water. Epidemiol Infect 1996;115:475-483.
49. Nikolovski, J., Nikolovski-Stefanovic, Z., Damjanovic, N., Kaluderovic, V. Selection and application of antibiotics in treatment of bacterial diseases in poultry. Zivinarstvo 1997;32:207-211.
50. Piddock, L.J.V., Wray, C., McClaren, I., Wise, R. Quinolone resistance in Salmonella sp.: veterinary pointers. Lancet 1995;336:125.
51. Shlosberg A, Ershov E, Bellaiche M, Hanji V, Weisman Y, Soback S. The effects of enrofloxacin on hepatic microsomal mixed function oxidase in broiler chickens. J Vet Pharmacol Ther 1995;18:311-313.
52. Sumano, L.H., Gracia, M.I., Romero, V., Ruiz-Ramirez, L. The use of ciprofloxacin in proprietary products of enrofloxacin. Vet Hum Toxicol 1994;5:476-477.
53. Sumano, L.H., and Ocampo, C.L. Compositional analysis surveillance of eleven trade of eleven trade brands of enrofloxacin including Baytril, for veterinary use. Zentralbl Veterinarmed A, 1995;10:669-73.
54. Inglis V. Cafini M. Yoshida T. The interaction of trimethoprim and quinolones against Gram-negative fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology. Vol 79(2) (pp 135-140), 1995.
55. Whittow, G. Sturkie's Avian Physiology Academic Press 15 January, 2000 Hardcover
56. Gómez-Gómez, J.M., Blázquez, J., Espinosa, M., Baquero, M.R., Baquero, F., Martínez, J.L. *In vitro* plasmid-encoded resistance to quinolones. Microbiology Letters. 1997; 154:271-276.

57. Schimitz, F.J., Fluit, Ad C., Brisse, S., Verhoef, J., Köhrer, K., Milatovic, D. 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
58. Varon, E., Gutmann, L. Mechanisms and spread of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* Res Microbiol 2000; 151:471-473.
59. Van Bambeke, Balzi, E., Tulkens, P.M. Antibiotic efflux pumps Biochem Pharmacol 2000; 60:457-470
60. Zhou J. Dong Y. Zhao X. Lee S. Amin A. Ramaswamy S. Domagala J. Musser JM. Drlica K. Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: Allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations. J Infect Dis. 2000; 182:517-525.
61. Bazile-Pham-Khac, S. Truong QueChi. Lafont, J. P. Gutmann, L. Zhou XiangYang. Osman, M. Moreau, N. J Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 1996; 40:1504-1507.
62. Medders, W. M. Wooley, R. E. Gibbs, P. S. Shotts, E. B. Brown, J Mutation rate of avian intestinal coliform bacteria when pressured with fluoroquinolones. Avian Dis 1998; 42:146-53
63. Dead Bugs Don't Mutate: Susceptibility Issues in the Emergence of Bacterial Resistance Stratton CW. Emergin infectious diseases 2003; 9:10-17
64. Wetzstein, H. G The in vitro postantibiotic effect of enrofloxacin. Proceedings 18th World Buiatrics Congress: 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, Italy, August 29-September 2, 1994. Volume 1. Societa Italiana di Buiatria, Bologna, Italy: 1994. 615-618.
65. Van Bambeke F, Michot JM, & Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cell: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. J Antimicrobial Chemother 2003; 51:1067-1077
66. Guan, L., Blumenthal, R.M., and Burnham, J.C. Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36:2118-2124.
67. Chan, L. Lowes, M.S., Hirst, H.B. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. European J Pharmaceutic Scienc 2004; 21: 25-51
68. Wachter, V.J., Salphati, L. and Benet, L.Z. Active secretion anteroctytic metabolism barriers to drug absorption. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 46:89-102
69. Hubert E, Mouton PR, Van Der Reyden T, Ruijus GJ, Biever M. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* sp isolated from human stools and poultry products. Lancet 1997;335:787
70. Jacobs-Reitsman WF, Kan CA, Bolder NM. The introduction of quinolones resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. Letters in App Microbiology 1994;4:228-231
71. Kho HB, Kang MI, Kim GN. Antimicrobial Drugs Susceptibility of *Micoplasma gallisepticum* isolated from cronic respiratory diseases outbreaks. Korean J Vet Public Helath. 1993;17:63-68
72. John TE., Ward RL., Frost AJ, & Willshaw AG. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacterial. Int.J. Food Microbiol. 2000; 62:1-5.
73. Wistrom J. & Norrby SR. Fluoroquinolones and bacterial enteritis, when and whom? J. Antim. Chemo. 1995; 36:23-39

74. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 5:2184-2185.
75. Bernkop-Schnürch A. (The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins *J. of Controlled release* 1998;52:1-16
76. Nikaido, H. and Thanassi, D.G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37:1393– 1399
77. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wachter VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol 62(1-2) (pp 25-31), 1999.
78. Thwaites DT, Stevens BC. H⁺-zwitterionic amino acid symport at the brush-border membrane of human intestinal epithelial (CACO-2) cells. *Experimental Physiology*. 84(2):275-84, 1999 Mar.
79. Hooper DC. Emergin mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases*. 2001; 7:337-341
80. Benet, L.Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J.A., Wachter, V.J. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery *J Controlled Release* 1999; 62:25-31.
81. Van Tellingen, O. The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology *Tox Letters* 2001; 120:31- 35.
82. Wandersman, C. Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res Microbiol* 1998; 149:163-170.
83. Nikaido, H. How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells? *Trends Microbiol* 2000; 8:481-483.
84. Baggot, J.D. Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals. *J Am Vet Med Assoc* 1980;10:085-1090.
85. Borgherini, G. The bioequivalence and therapeutic efficacy of generic versus brand-name psychoactive drugs. *Clin ther* 2003; 6:1578-1592
86. Durcharme, M.P., Potvin D. Understanding Bioequivalence – The Experience of a Global Contract Research Organisation. *Businessbriefing : pharmagenetics* 2003; 53-57
87. Estévez, C.F.E. Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos. *Rev. Med Uruguay* 200; 16:133-145.
88. Baquero, F. and Blázquez, J. (1997) Evolution of antibiotic resistance. *TREE* 12:482-487.
89. Sumano, L.H., Negrón, G., Fernández, G. Consideraciones prácticas y farmacológicas para medicación de antibacterianos en avicultura. *Revista Científica. Fac. de Ciencias Vet. Universidad de Zulia*. 2000; 3:251-266.
90. Sumano, L.H., Gutiérrez, O.L. Farmacocinética clínica veterinaria. ¿Para qué?. *Imagen Veterinaria* 2001; 2:25-30.
91. Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Gutiérrez OL. Bioequivalence of 9 trademarks of enrofloxacin and Baytril in cows. *Dtsch. Tierarzt Wochenschrift*. 2001: 108;311-314.
92. Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Gutiérrez, O.L. Bioequivalence of six generic preparations of enrofloxacin in pigs. *Pig Vet J* 2003; 51:64-73.

93. Sumano, L.H., Gutierrez, O.L., Zamora, M.A. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J Vet Pharmacol Therap* 2001; 24:309-313.
94. Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Beijsterveldt, L., Anciaux, K., Verboven, P., Meuldermans, W. and Lavrijsen, K. Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development. *Current Topics Medicin Chem* 2001; 1:367-383
95. Manthena, V.S., Varma, Y.A., Chinmoy, S.D. and Ramesh P. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacologic Res* 2003; 48:347-359
96. Gutierrez, O.L., Sumano, L.H., Zamora, Q.M. Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations *Vet Rec* 2002; 16:350-353