



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

---

**APLICACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN MEDICINA  
VETERINARIA: CRITERIOS FARMACOCINÉTICOS Y  
FARMACOCINÉTICOS/FARMACODINÁMICOS (PK/PD)**

---

**APPLICATION OF FLUOROQUINOLONES IN VETERINARY  
MEDICINE: PHARMACOKINETIC AND  
PHARMACOKINETIC/PHARMACODYNAMIC CRITERIA  
(PK/PD)**

---

Memoria presentada por  
Pedro Marín Carrillo  
Para optar al grado de Doctor en  
Veterinaria

**2008**

*A Vanesa,*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis, y especialmente:

A mis padres por inculcarme sus principios y estar siempre a mi lado, a mis hermanas Encarnita y Maria Dolores por su apoyo, comprensión y confianza, y a Vanesa, por los ánimos, la espera y el apoyo demostrado durante todos estos años.

Al director de esta tesis, el profesor Dr. Carlos M. Cárceles Rodríguez, por su extraordinaria guía, ideas y colaboración, por su apoyo, ilusión y confianza demostrada en todo momento, por su amistad.

A la profesora Dr. Elisa Escudero Pastor, que con su calidad científica y humana, han eso posible que este trabajo saliese adelante, dedicándole tiempo y guiándome con sus buenos consejos.

Al profesor Dr. Emilio Fernández Varón por su ayuda y consejo en la realización de la misma.

A Elena Badillo, por el apoyo prestado, por los buenos y malos momentos, por ser excelente compañera, por su amistad.

Al Dr. Alberto Espuny Miró, por su predisposición, en todo momento, a prestar asesoramiento y ayuda.

A M<sup>a</sup> Jose Bovaira García por su inestimable colaboración y apoyo prestado.

A todos los alumnos internos de la Unidad Docente de Farmacia, Farmacología y Terapéutica Veterinaria de la Facultad de Veterinaria, Ignacio Martínez Robles, Javier S. Moreno García, David Castro Valle y Omar El Hammoumi por crear un ambiente tan cordial y por su amistad.

A los M-MEN por todo lo compartido en estos años de andadura en la facultad.

A los que olvido para que ellos no me olviden.

## ÍNDICE/INDEX

<b>1.- Introducción</b>	1
<b>2.- Revisión bibliográfica</b>	4
2.1.- Estructura química y clasificación	5
2.2.- Relación estructura-actividad	6
2.3.- Mecanismo de acción	7
2.4.- Farmacocinética	8
2.4.1.- Biodisponibilidad	9
2.4.2.- Unión a proteínas plasmáticas y distribución tisular	10
2.4.3.- Aclaración plasmática y eliminación	11
2.4.4.- Penetración en leche	12
2.4.5.- Diferencias interespecíficas	13
2.5.- Integración farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD)	15
2.6.- Toxicidad e interacciones medicamentosas	18
2.7.- Resistencias bacterianas	19
<b>3.- Objetivos</b>	23
<b>4.- Introduction</b>	25
<b>5.- Bibliographical review</b>	28
5.1.- Chemical structure and classification	29
5.2.- Structure-activity relationships	30
5.3.- Mechanism of action	31
5.4.- Pharmacokinetics	33
5.4.1.- Bioavailability	33
5.4.2.- Plasma protein binding and tissue distribution	34
5.4.3.- Clearance and elimination	35
5.4.4.- Penetration into milk	36
5.4.5.- Interspecies differences	37
5.5.- Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships (PK/PD)	39
5.6.- Toxicities and drug-drug interactions	42
5.7.- Resistances	43
<b>6.- Aims</b>	47

<b>7.- Trabajos publicados/ Published papers</b>	<b>49</b>
7.1.- Pharmacokinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and intragastric administration to horses	50
7.2.- Pharmacokinetics of danofloxacin in horses after intravenous, intramuscular and intragastric administration	51
7.3.- Pharmacokinetics of moxifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and a long-acting Poloxamer 407 gel formulation administration	52
7.4.- Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats	53
7.5.- Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats	54
7.6.- Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits	55
7.7.- Development of a method for the determination of ibafloxacin in plasma by HPLC with fluorescence detection and its application to a pharmacokinetic study	56
7.8.- Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of difloxacin in sheep	57
7.9.- Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to lactating goats	58
7.10.-Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of orbifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration	59
<b>8.- Materiales y métodos</b>	<b>60</b>
8.1.- Animales	61
8.2.- Protocolo experimental	61
8.3.- Técnicas analíticas	63
8.4.- Método de validación	64
8.5.- Análisis farmacocinético	66
-Análisis Compartmental. Plasma	66
-Análisis No Compartmental. Plasma	67
-Análisis de los datos en leche	67
8.6.- Métodos estadísticos	67
8.7.- Aislados bacterianos y obtención de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)	67

<b>9.- Materials and methods</b>	<b>69</b>
9.1.- Animals	70
9.2.- Experimental design	70
9.3.- Analytical method	71
9.4.- Method validation	73
9.5.- Pharmacokinetic analysis	75
-Compartmental analysis. Plasma	75
-Noncompartmental analysis. Plasma	75
-Noncompartmental analysis. Milk	75
9.6.- Statistical methods	75
9.7.- Bacterial isolates and minimum inhibitory concentrations (MICs)	76
<b>10.- Resultados</b>	<b>77</b>
10.1.-Técnica de determinación de ibafloxacin	78
10.2.-Estudio farmacocinético	79
10.2.1.- Modelo farmacocinético	79
10.2.2.- Parametros farmacocinéticos	81
10.2.2.1.- Semividas	81
10.2.2.2.- Tiempo medio de residencia (MRT)	83
10.2.2.3.- Volúmenes de distribución aparentes en estado estacionario	86
10.2.2.4.- Aclaramiento plasmático	87
10.2.2.5.- Área bajo la curva (AUC)	88
10.2.2.6.- Biodisponibilidad	90
10.2.2.7.- Concentración plasmática máxima	91
10.2.2.8.- Tiempo máximo	92
10.3.-Estudio farmacocinético: leche (cabra)	94
10.3.1.- Evolución de las concentraciones en leche de ibafloxacin, difloxacin y orbifloxacin	94
10.3.2.- Semividas	95
10.3.3.- Concentración máxima	96
10.3.4.- Tiempo máximo	97
10.3.5.- Ratios $AUC_{LE}/AUC_{PLAS}$	98
10.3.6.- Ratios $C_{MAX-LE}/C_{MAX-PLAS}$	98
10.4.-Integración farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD)	99
<b>11.- Results</b>	<b>103</b>
11.1.-Analytical method for ibafloxacin determination	104
11.2.-Pharmacokinetic analysis	105
11.2.1.- Pharmacokinetic model	105
11.2.2.- Pharmacokinetic parameters	107
11.2.2.1.- Half-lives	107



11.2.2.2.- Mean residence times (MRT)	108
11.2.2.3.- Apparent volume of distribution at steady state	111
11.2.2.4.- Clearance	112
11.2.2.5.- Area under the plasma concentration-time curve (AUC)	113
11.2.2.6.- Bioavailability	114
11.2.2.7.- Maximum concentration	115
11.2.2.8.- Time of maximum concentration	116
11.3.-Pharmacokinetic analysis: Milk (goats)	118
11.3.1.- Milk concentrations of ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin	118
11.3.2.- Half-lives	119
11.3.3.- Maximum concentration	120
11.3.4.- Time of maximum concentration	121
11.3.5.- Ratios $AUC_{milk}/AUC_{plasma}$	121
11.3.6.- Ratios $C_{max-milk}/C_{max-plasma}$	122
11.4.-Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships (PK/PD)	122
<b>12.-Conclusiones</b>	<b>126</b>
<b>13.-Conclusions</b>	<b>131</b>
<b>14.-Bibliografía/References</b>	<b>136</b>
<b>15.-Apéndices/Appendixes</b>	<b>150</b>
15.1.-Gráficos/Figures	151
15.2.-Índice de impacto/Impact factor	162



## **1.- INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias constituyen un problema amplio dentro de la Medicina Veterinaria, afectando a especies de compañía, de producción, deportivas y silvestres. El daño causado por las mismas es difícil de valorar económicamente ya que, si bien es posible contabilizar el gasto debido a medicación, honorarios del veterinario y bajas de los animales, es más complejo (aunque no imposible) valorar las pérdidas por una inadecuada o nula producción, por mal rendimiento deportivo o, simplemente por la pérdida sentimental que pueda suponer para el dueño.

El uso de antibióticos es necesario y, debido a la diversidad de especies patógenas, algunas de ellas intracelulares, es preciso contar con el antibiótico adecuado.

Las fluoroquinolonas son fármacos antimicrobianos bactericidas con excelente actividad frente a un amplio espectro de bacterias aerobias y contra micoplasmas (Giles et al., 1991; Hannan et al., 1997; Appelbaum y Hunter, 2000). Debido a su bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas tienen volúmenes de distribución elevados y presentan buena penetración en células y tejidos. Son, por ello, unos agentes valiosos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias intracelulares (Hooper, 1998). Son útiles en el tratamiento de infecciones del aparato respiratorio y tejidos blandos, y quizá en el tratamiento de mamitis. Por otro lado, existe un gran interés tanto de la industria farmacéutica como del sector ganadero y veterinario por disponer de nuevas fluoroquinolonas.

El conocimiento completo de la farmacocinética de las fluoroquinolonas en animales sanos es el primer paso para valorar de forma precisa, si su uso en dichas especies puede contemplarse o no. Conocidos los parámetros farmacocinéticos, lo que aporta datos sobre los fenómenos de disposición y eliminación específicos, si son óptimos, hay que realizar un estudio integrado con parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. Con esta integración PK/PD se pueden establecer posibles regímenes de aplicación con una óptima relación dosis-eficacia terapéutica. Finalmente, estas posologías deberán ser valoradas, en cuanto a eficacia, en ensayos clínicos controlados.

El comportamiento farmacocinético de un determinado fármaco varía en las diversas especies animales, incluso muy cercanas filogenéticamente (Escudero et al., 1999), debido a diferencias morfológicas y fisiológicas: aparato digestivo, funcionalidad hepática, funcionalidad renal, ritmo cardíaco, etc. Ello obliga a evitar las extrapolaciones

de posologías de una especie a otra, en la medida de lo posible. Por ello es necesario estudiar el comportamiento farmacocinético de cada fármaco en las especies en que se pretende aplicar.

El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos orgánicos, tejidos y excrementos, así como su respuesta farmacológica, y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos. Los datos se procesan empleando modelos matemáticos a los que se ajustan las concentraciones, las cantidades de fármaco o sus metabolitos en la totalidad del organismo, o en alguna de sus partes. Las ecuaciones así obtenidas sirven para formular predicciones acerca de los resultados que se obtendrían en tratamientos medicamentosos, ya que la respuesta farmacológica viene determinada por la cantidad de fármaco que accede a los lugares de acción, y este acceso está condicionado por la concentración sanguínea del fármaco.

En las especies animales de producción de alimentos los antibióticos son, sin duda, medicamentos usados con mucha frecuencia, casi sistemáticamente. De ello se derivan una serie de circunstancias, entre las que destacan:

- el coste total del tratamiento, que supone un incremento en los gastos de producción. En este sentido, debido a que el rendimiento neto es menor, hemos de procurar que estos gastos sean mínimos, sin que por ello disminuya la eficacia del tratamiento.

- el mantenimiento de unos niveles eficaces de fármaco es fundamental en cualquier tipo de tratamiento, pero con los antibióticos es, además, imprescindible, ya que de no observarse esta condición, se pueden producir resistencias bacterianas, con los inconvenientes que ello conlleva, junto con la menor o nula eficacia del tratamiento y el innecesario incremento de los costes de producción.

- otro de los aspectos de mayor relevancia, es evitar la presencia de residuos en los productos alimenticios de origen animal destinados al consumo humano.

Todo ello nos ha llevado a investigar diversos antibióticos de este grupo en especies de interés veterinario. Algunos de estos fármacos están registrados para su uso en especies animales y otros registrados para su uso en el hombre, y por tanto con una potencial aplicación en Medicina Veterinaria.

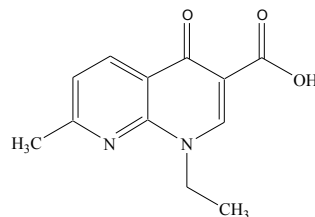
## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. Estructura química y clasificación

Las quinolonas, también llamadas 4-quinolonas o ácidos carboxílicos quinolónicos, comprenden un amplio grupo de agentes antimicrobianos sintéticos. El primer fármaco de esta clase, el ácido nalidíxico, fue sintetizado en 1962 mediante una modificación de un compuesto aislado durante la producción del antimalárico cloroquina. Su espectro antibacteriano está limitado a *Enterobacteraceae*, y debido a limitaciones en su absorción y distribución, este fármaco es efectivo solamente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, ya que se elimina por vía renal alcanzando altas concentraciones en orina. En 1980, la adición de una molécula de flúor en posición 6 y la adición de un anillo de piperazina en posición 7 de la estructura quinolónica básica, incrementó su capacidad de absorción y distribución en tejidos y la actividad antibacteriana quinolónica, ganando efectividad contra organismos como *Pseudomonas aeruginosa* y cocos Gram positivos (Ball, 2000; Martínez et al., 2006). Las quinolonas que poseen esta molécula de flúor son conocidas como fluoroquinolonas.

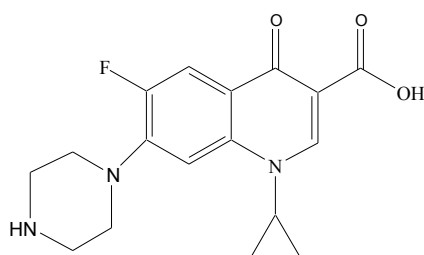
De forma general, las quinolonas pueden clasificarse en tres generaciones:

1. **Primera generación:** comprende los compuestos quinolónicos originales como el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico y cinoxacino. Estas moléculas se caracterizan por una pobre biodisponibilidad oral, una limitada distribución en tejidos y un limitado espectro de acción, restringido a *Escherichia coli* y algunos organismos Gram negativos.



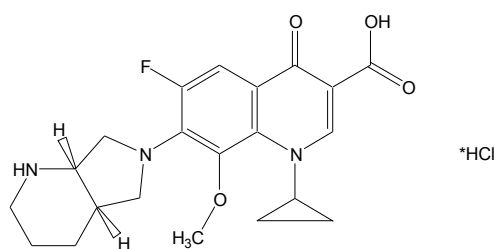
Ácido nalidíxico

2. **Segunda generación:** la primera de las fluoroquinolonas, fue desarrollada en 1980. Estas moléculas mostraron un incremento de la actividad antibacteriana contra *Enterobacteriaceae* y gérmenes Gram negativos (como *P. aeruginosa*) y algo de actividad contra cocos Gram positivos. Los cambios estructurales asociados a esta segunda generación incrementaron también su biodisponibilidad oral y distribución sistémica. Dentro de esta categoría encontramos quinolonas como norfloxacin, ciprofloxacino, enrofloxacin, danofloxacin, difloxacino y marbofloxacino.



Ciprofloxacin

3. **Tercera generación:** esta generación mantiene las características favorables de la segunda generación, mientras muestran un aumento de actividad contra bacterias Gram positivas, anaerobios y micobacterias. Estos fármacos también poseen una excelente biodisponibilidad oral y una prolongada semivida. La tercera generación tiene menor toxicidad sobre el sistema nervioso central y menor interacción con el sistema del citocromo P450 (Ball, 2000; Martínez et al., 2006). Aquí se incluyen: orbifloxacin, levofloxacin, esparfloxacin, moxifloxacin, grepafloxacin y gatifloxacin, entre otros.



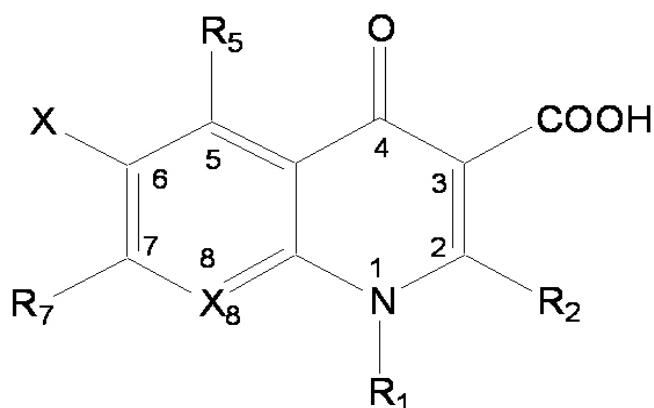
Moxifloxacin

## 2.2. Relación estructura-actividad

Desde el descubrimiento de los efectos terapéuticos del ácido nalidíxico, se iniciaron modificaciones estructurales en el núcleo y en los sustituyentes de las quinolonas, con el fin de mejorar su potencia y espectro antibacteriano y reducir los efectos adversos. Desde esa fecha, han sido sintetizados varios miles de compuestos. Diversos estudios han mostrado que hay varios componentes en el núcleo de las quinolonas que, cuando son manipulados, pueden incrementar su actividad antibacteriana. El núcleo incluye un grupo etilo en posición N-1, un grupo carboxílico en C-3, un átomo de oxígeno en C-4 y un átomo de flúor en C-6. De todos ellos, la adición del átomo de flúor en posición 6 fue el cambio que amplió substancialmente el espectro de acción de las quinolonas (Wright et al., 2000). Esta modificación también aumentó la biodisponibilidad oral y la penetración en tejidos de dichas moléculas. Como resultado de este



descubrimiento, hoy todas las 4-quinolonas comercializadas para uso clínico están halogenadas en posición 6. Algunas también están halogenadas en posición 8.



### 2.3 Mecanismo de acción

En numerosas especies de bacterias, las fluoroquinolonas dañan el ADN, provocando alteraciones en el superenrollamiento negativo (Gellert et al., 1977). Este efecto es debido a la inhibición de la actividad de la ADN-girasa.

La holoenzima activa es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades llamadas *gyrA* y otras dos *gyrB* (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). La subunidad *gyrA* se une al ADN y actúa en la rotura y reparación de los filamentos, mientras que la *gyrB* contiene los sitios de unión al ATP. La actividad de la *gyrA* se desarrolla anclándose en ambas hebras del ADN (mediante la formación de un enlace covalente enzima-ADN) y provocando la rotura y reunión de las hebras. En vivo, este proceso supone dos superenrollamientos negativos y la hidrólisis de ATP. La topoisomerasa IV, codificada por los genes *parC/parE*, es otro blanco de las fluoroquinolonas. Esta enzima es también una proteína multimérica compuesta por dos subunidades *parC* y dos subunidades *parE*, las cuales tienen secuencias homólogas a las subunidades *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Esta enzima provoca relajación de la doble hebra de ADN y evita la unión de los cromosomas hijos tras la replicación (Zechiedrich y Cozzarelli, 1995).

Cuando la ADN-girasa es expuesta a una quinolona, el fármaco interactúa en la superficie del dominio alfa-helicoidal de la enzima comprometiendo el anclaje y reparación del ADN. Los efectos tóxicos aparecen por la formación de un complejo

irreversible formado por quinolona, girasa y ADN (Gellert et al., 1977). Este complejo evita la progresión de la horquilla de replicación y complejos de transcripción (Willmott et al., 1994), conduciendo a la fragmentación del cromosoma y a la muerte celular.

Los efectos de las fluoroquinolonas sobre la proliferación bacteriana sugieren tres mecanismos de muerte celular (Guthrie et al., 2004; Maxwell y Critchlow, 1998):

1. Mecanismo A: común a todas las fluoroquinolonas. Este requiere ARN y síntesis de proteínas y es solamente efectivo con bacterias en división. Este mecanismo bloquea la replicación mediante la formación del complejo girasa-quinolona sobre el ADN.

2. Mecanismo B: no requiere ARN ni proteínas de síntesis y puede actuar sobre bacterias que no están multiplicándose. Provoca una dislocación de las subunidades de la girasa y formación de un complejo ternario.

3. Mecanismo C: requiere ARN y proteínas de síntesis, pero no que las bacterias estén dividiéndose. Atrapa la topoisomerasa IV sobre el ADN.

Las fluoroquinolonas, como las penicilinas, exhiben un efecto paradójico. Las curvas de supervivencia muestran que cuando la concentración de fluoroquinolonas está cerca de la concentración mínima inhibitoria (CIM ó MIC) de la bacteria, el fármaco detiene el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático). Sin embargo cuando se incrementa la concentración de las quinolonas en relación a las CMI's bacterianas, aumenta la muerte celular hasta una cierta concentración de fármaco (concentración bactericida óptima). Un incremento por encima de esta concentración óptima puede conducir a un descenso del efecto bactericida. Esta relación entre el efecto de las quinolonas y su concentración se debe a las diferencias entre la concentración necesaria para inhibir el superenrollamiento y la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. En general, parece que la reacción de superenrollamiento de la girasa es menos sensible a las quinolonas que el crecimiento bacteriano (Guthrie et al., 2004; Maxwell y Critchlow, 1998).

#### **2.4. Farmacocinética**

Particularmente importantes son las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas de un fármaco, que condicionan la elección de la dosis de un antibiótico, sobre todo, cuando se presentan alguno de estos procesos:

1. El animal tiene alterada la función renal o hepática. En este caso, el aclaramiento puede estar comprometido, causando un incremento de la concentración sistémica de fármaco, que puede afectar a su seguridad.
2. La infección esta asociada a una descarga purulenta (pudiendo verse afectada la unión a proteínas y la difusión del fármaco en la zona infectada) o en una zona difícilmente accesible para el antibiótico.
3. La susceptibilidad del patógeno es desconocida o el patógeno es clasificado como *intermedio* por los criterios del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
4. Las condiciones de dosificación (p.e.: presencia de comida tras una administración oral) pueden afectar a la biodisponibilidad del fármaco y por tanto al nivel de exposición sistémica.
5. Si hay un uso concomitante de otro fármaco, puede dar lugar a interacciones.
6. Si el animal está infectado con una cepa bacteriana altamente virulenta o tiene su función inmune comprometida (p.e.: animales geriátricos, animales tratados con corticoides).
7. Si queremos limitar la probabilidad de aparición de resistencias.

Por tanto, vamos a analizar a continuación las características farmacocinéticas que presentan las fluoroquinolonas.

#### **2.4.1. Biodisponibilidad**

Aunque hay importantes variaciones individuales entre las diferentes quinolonas en las diferentes especies de animales, en general, las fluoroquinolonas son rápidamente absorbidas tras su administración oral en animales de estómago monocavitario, mientras que en rumiantes, las concentraciones sistémicas alcanzadas tras la administración por esta vía están por debajo de los niveles terapéuticos. Por ejemplo, la biodisponibilidad oral de enrofloxacin en rumiantes adultos alcanza solo el 10%, mientras que en no rumiantes es mayor del 80% (Greene y Budsberg, 1993; Vancutsem et al., 1990).

En general, a menos que las administremos con alimentos que contengan alta cantidad de cationes divalentes, la administración oral postprandial de fluoroquinolonas no va a sufrir una disminución clínicamente importante, en su biodisponibilidad. Sin embargo, debido a la naturaleza lipofílica de las quinolonas, los alimentos pueden incrementar su

biodisponibilidad oral y, por tanto, aumentar las concentraciones sistémicas. Por ejemplo, si administramos ibafloxacinó junto con alimentos, se produce un incremento del AUC y  $C_{\max}$  en gatos (Coulet et al., 2005).

La lipofilia de estas moléculas promueve su absorción por difusión pasiva, pero los mecanismos de difusión no pasiva pueden influir también en la absorción intestinal (Dautrey et al., 1999; Rabbaa et al., 1997). El transporte mediado por transportadores a través de la membrana apical, ha sido demostrado con esparfloxacinó, levofloxacinó, ciprofloxacino y norfloxacino (Griffiths et al., 1994; Rabbaa et al., 1997). Es muy importante en este proceso que el fármaco esté completamente disuelto para que sea absorbido en los segmentos intestinales. Si no ocurre así, la biodisponibilidad oral será pobre y las concentraciones plasmáticas menores de las esperadas. También puede ocurrir una saturación de estos transportadores y el establecimiento de un proceso de competición por otras moléculas (Griffiths et al., 1994).

Este sistema de transportadores puede ser un importante mecanismo en la eliminación de quinolonas, debido a la secreción activa de fármaco desde la sangre a la luz intestinal. Ciprofloxacino, norfloxacino y perfloxacino sufren este mecanismo de eliminación (Dautrey et al., 1999; Griffiths et al., 1994). Además, esta secreción intestinal puede llevarse a cabo por diferentes transportadores para las distintas fluoroquinolonas. Así, mientras esparfloxacinó es un sustrato de la P-glicoproteína, el transporte de ciprofloxacino puede ser mediado por transportadores catiónicos y/o aniónicos orgánicos (Dautrey et al., 1999).

#### **2.4.2. Unión a proteínas plasmáticas y distribución tisular**

La actividad *in vivo* de un agente antimicrobiano, debida a la capacidad del fármaco para pasar de la sangre a los tejidos, depende de la fracción libre de dicho fármaco. Por tanto, cuando usamos las características farmacocinéticas y farmacodinámicas para evaluar una dosis apropiada de una quinolona, es más interesante conocer la fracción libre de fármaco que la concentración total de éste (Bergogne-Berezin, 2002; Craig y Ebert, 1989; Drusano, 2002). A este respecto, es importante reseñar que las CMI's calculadas *in vitro* son determinadas en base a la concentración de fármaco libre. Desafortunadamente, en la bibliografía veterinaria, se le da muy poca importancia a este factor, y la mayoría de estudios farmacocinéticos expresan sus parámetros (p.e.: AUC,  $C_{\max}$ ) para concentración total de fármaco.

La existencia de barreras pueden dificultar la difusión de un antibiótico al sitio de infección, provocando diferencias entre la concentración plasmática de fármaco y las concentraciones a las que están expuestos los microorganismos. Ejemplos de estas barreras son los abscesos, la barrera hemato-encefálica y la pared bacteriana (Costerton et al., 1999; Toutain et al., 2002). Por esta razón, comprender la respuesta de un agente infeccioso, nos facilitará desarrollar y usar los ratios farmacocinéticos/farmacodinámicos para calcular la dosis óptima. De forma similar, la comprensión de las características de unión de un antibiótico y su capacidad para difundirse en tejidos a través de las barreras biológicas, ayudará a los clínicos a definir una apropiada pauta terapéutica.

Las fluoroquinolonas poseen, en general, amplios volúmenes de distribución, mayores de 1.0 L/kg (Aminimanizani et al., 2001; Lode et al., 1998). Cuando consideramos estos valores es importante conocer que los volúmenes de los fluidos corporales compartimentalizados son alrededor de 0.05 L/kg para plasma, 0.2 L/kg para fluidos extracelulares y 0.7 L/kg para el agua corporal total (Wamberg et al., 2002). Volúmenes superiores a 0.7 L/kg indican que el fármaco está unido preferentemente a tejidos, pudiendo o no estar disponible para su función, y pudiendo haber sido secuestrado en el interior de las células. No obstante, cuando consideramos la concentración de antibiótico intersticial libre, se ha confirmado que esta concentración es comparable a la concentración del fármaco libre en plasma (Araki et al., 1997). Por tanto, excluyendo las situaciones asociadas a la captación iónica, alcanzado el equilibrio de concentraciones (libre) entre sangre y tejidos (Muller et al., 1999), las concentraciones de fármaco libre en tejidos pueden preverse en base a la concentración de fármaco libre en plasma, incluso en casos en que la unión a proteínas no es lineal (Kovar et al., 1997).

### **2.4.3. Aclaramiento plasmático y eliminación**

Las fluoroquinolonas, pueden ser clasificadas por su principal mecanismo de eliminación (Karablut y Drusano, 1993):

1. Vía renal : enrofloxacin, orbifloxacin, ofloxacin, temafloxacin y lomefloxacin.
2. Vía hepática: difloxacin y perfloxacin.
3. Con ambos mecanismos renal y hepático: marbofloxacin, danofloxacin, norfloxacin y ciprofloxacin.

El metabolismo hepático que sufren las fluoroquinolonas varía en las distintas especies animales y para las distintas quinolonas, lo que se traduce en un amplio rango de semividas (Greene y Budberg, 1993; Nix y Schentag, 1998; Vancutsem et al., 1990). El metabolismo hepático de estos antibióticos incluye reacciones de glucuroconjugación (moxifloxacino, grepafloxacino, cinafloxacino y esparfloxacino), N-oxidación y desmetilación (levofloxacino), y se lleva a cabo principalmente por el sistema del citocromo P450 (Bergogne-Berezin, 2002)

Como se dijo, las quinolonas pueden verse afectadas por la secreción activa a través de la membrana intestinal. Además, las concentraciones intestinales de estos antibióticos también pueden variar en función de la secreción biliar y la existencia del ciclo enterohepático, que puede incrementar el tiempo de residencia de estos fármacos en el organismo. Por ejemplo, en perros Beagles, el 80% de una dosis intravenosa de difloxacino es eliminada en heces (Federal Register, 1998) debido a la secreción biliar. Aproximadamente el 72-80% del fármaco en bilis es un éster glucurónido y solamente el 6-9% está sin biotransformar. La forma glucurónida es hidrolizada en intestino, dando lugar a la forma original, que es reabsorbida. Como consecuencia de esto, la semivida del difloxacino en perros tras administración oral es de 9.4 horas.

La extensión de la eliminación renal de las fluoroquinolonas varía entre ellas. Levofloxacino y gatifloxacino se eliminan principalmente por el riñón, con un aclaramiento renal de levofloxacino mayor que el aclaramiento de la creatinina, aproximadamente un 60%, lo que sugiere la existencia de filtración glomerular y secreción tubular (Okazaki et al., 1991).

#### **2.4.4. Penetración en leche**

La mastitis es un problema muy importante en la producción lechera caprina, ovina y bovina, no solo por las pérdidas económicas que provoca a los productores, sino también por la seguridad e higiene de los alimentos producidos para consumo humano. Generalmente las fluoroquinolonas se distribuyen ampliamente en la ubre, aunque su disposición depende de la especie animal. En caprino, los regímenes de dosificación son normalmente extrapolados de parámetros farmacocinéticos de ovino y bovino, pudiendo dar lugar a dosis inapropiadas que conducen a niveles terapéuticos no efectivos, y por tanto, al riesgo de desarrollo de resistencias. Igualmente, si extrapolamos dosis demasiado elevadas, pueden aparecer efectos tóxicos.

Por ello, resulta necesario investigar la disposición de las fluoroquinolonas en caprino, así como su eliminación en leche, para evaluar su uso potencial en esta especie.

Hay que tener en cuenta cuando se realizan estudios farmacocinéticos de eliminación en leche de un fármaco en animales sanos, que la mastitis provoca una serie de cambios físicos y químicos en la leche y en la glándula mamaria que pueden alterar la distribución del antibiótico en dicho compartimento. La inflamación de la glándula mamaria va a conducir a cambios de la permeabilidad vascular y en la composición de la leche. El pH generalmente aumenta, la concentración de caseína desciende, la concentración de albúmina y células somáticas se incrementa, y los niveles de grasa pueden descender (todo ello genera alteraciones farmacocinéticas que no son debidamente consideradas). Todos estos factores tienen un impacto sobre la farmacocinética del fármaco, sin embargo, su importancia no es bien comprendida aún (Gehring y Smith, 2006). Por ejemplo, Fang y Pyörälä (1996) mostraron que la actividad de enrofloxacin en leche procedente de ubres sanas contra cepas de *E. coli*, se reducía a la mitad, mientras mantenía similar actividad en leche de ubres con mastitis.

#### 2.4.5. Diferencias interespecíficas

Existen importantes diferencias farmacocinéticas ínterespecíficas en las distintas fluoroquinolonas. Por ejemplo, el aclaramiento (Cl) de difloxacin en cerdos (0.16 L/kg/h) es substancialmente menor que en pollos (0.72 L/kg/h). Sin embargo, en pollos encontramos un volumen de distribución ( $V_{ss} = 3.06$  L/kg) mayor que en cerdos ( $V_{ss} = 1.7$  L/kg) (Inui et al., 1998). Consecuencia de este mayor aclaramiento es que la semivida en pollos (4.1 h), tras una administración intravenosa, es más corta que la de cerdos (7.92 h). Tras la administración oral, la biodisponibilidad fue similar en ambas especies ( $F_{cerdos} = 93.7\%$ ;  $F_{pollos} = 86.9\%$ ).

La farmacocinética de moxifloxacin ha sido estudiada en seis especies de mamíferos: hombre, perro, cobaya, ratón, mono y rata (Siefert et al., 1999). En la siguiente tabla podemos observar las diferencias entre especies respecto a biodisponibilidad ( $F$ ), semivida ( $T_{1/2\lambda z}$ ) y porcentaje de unión a proteínas plasmáticas ( $\% f$ ) tras su administración oral:

Especies	F (%)	$T_{1/2\lambda z}$ (h)	% f
Ratón	78	0.93	31
Rata	78	1.2	37
Mono	52	6.9	38
Perro	91	8.6	29
Cobaya	54	5.7	37
Hombre	82	13	45

Cox et al. (2004) analizaron las relaciones alométricas para CI y  $V_{ss}$  en diferentes especies de mamíferos (vacuno, cerdo, oveja, perro, rata, mono, cabra, búfalo y hombre) para ciprofloxacino y describieron las siguientes relaciones estimadas:

$$CI = 20.6 \text{ (mL/min)} \times BW^{0.815}, r = 0.95,$$

$$V_{ss} = 3.5 \text{ (L)} \times BW^{0.947}, r = 0.93.$$

En el mismo estudio, Cox y sus compañeros examinaron también las relaciones alométricas para enrofloxacin. El gráfico resultante de la representación de log BW frente log CI o log  $V_{ss}$  mostró una importante dispersión. Sin embargo, aunque exista un valor alto de r, puede no ser muy precisa la extrapolación a especies desconocidas con las relaciones alométricas para el CI y el  $V_{ss}$ . Particularmente, pueden ocurrir grandes errores de extrapolación cuando intentamos predecir parámetros farmacocinéticos en grandes especies como el caballo y en terneros. También hay numerosos casos en que ecuaciones con bajos valores de r predicen extrapolaciones de forma muy precisa para especies animales desconocidas (Mahmood, 2001).

En la siguiente tabla se muestran diferentes valores de semividas ( $T_{1/2\lambda z}$ ) y biodisponibilidad (F), para diferentes fluoroquinolonas (AliAbadi y Lees, 2002, Carretero et al., 2002, Fernández-Varón et al., 2006a, Greene y Budsberg, 1993, Mann y Frame, 1992, McKellar et al., 1998, Siefert et al., 1999, Waxman et al., 2001):



	<i>Enrofloxacino</i>		<i>Danofloxacino</i>		<i>Marbofloxacino</i>	
	<i>F(PO)</i>	Terminal <i>T</i> <sub>1/2</sub> (h)	<i>F(IM)</i>	Terminal <i>T</i> <sub>1/2</sub> (h)	<i>F(IM)</i>	Terminal <i>T</i> <sub>1/2</sub> (h)
Pollo	101	15.6				
Pavo	61	3.9				
Ternero	8	15.4	78	2.9	100	4.2
Cerdo			76	6.8		
Oveja			95.7	3.35		
Perro	91	4.9				8.6
Caballo	60	5.6	88.5	5.36	88	4.7
Cabra					100	7.2

### 2.5. Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)

La relación entre farmacocinética y actividad microbiológica (farmacodinámica) de las fluoroquinolonas permite determinar la dosis necesaria para lograr el resultado clínico deseado. Las quinolonas son antibióticos concentración dependiente (Zhanel, 2001), en estos casos, los parámetros que mejor se relacionan con la eficacia de un antibiótico son las relaciones  $AUC_{0-24h} / CMI$  y  $C_{max} / CMI$  ya que se consigue un mayor efecto bactericida (mayor eliminación de bacterias) cuanto mayor es la concentración en contacto con esas bacterias.

La ratio  $C_{max} / CMI$  es particularmente importante en presencia de bacterias con CMIs elevadas o en presencia de bacterias con una capacidad de proliferación elevada (Craig y Dalhoff, 1998). En este último caso, las bacterias tienen una mayor probabilidad de sufrir una mutación, que podría conducir a la creación de una población bacteriana menos susceptible. En los procesos infecciosos donde hay una alta carga bacteriana, la probabilidad de mutación es mayor (Craig y Dalhoff, 1998; Drusano et al., 1993). Diversas investigaciones han demostrado que las fluoroquinolonas con una ratio  $C_{max} / CMI_{90} > 3$  provocan una reducción en el recuento bacteriano de un 99%, y con ratio  $C_{max} / CMI_{90} \geq 8$ , previenen la aparición de microorganismos resistentes (Craig, 1998). Estas ratios aseguran

un incremento de la mortalidad de organismos sensibles, un aumento de la mortalidad o inhibición de bacterias con altos valores de CMI y, por tanto, un menor número de microorganismos que facilita la acción de las defensas orgánicas cuando las concentraciones sistémicas del antibiótico son mínimas. Altas concentraciones de antibiótico, en relación a la CMI de los microorganismos, también contribuyen a incrementar el efecto post-antibiótico (PAE). El PAE *in vivo*, es mayor que *in vitro* para la mayoría de los microorganismos, a excepción de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. Por tanto, una adecuada ratio  $C_{\max}/CMI_{90}$  será fundamental para retrasar el recrecimiento de patógenos, por varias horas. El resultado de usar este tipo de regímenes de dosificación es una menor cantidad de microorganismos capaces de producir subpoblaciones resistentes.

A pesar de que existe una gran cantidad de información sugiriendo que las fluoroquinolonas son altamente efectivas en presencia de un alto ratio  $C_{\max}/CMI_{90}$ , se han observado excepciones que rompen la regla. Por ejemplo, en el caso de *Bacillus anthracis*, ciertos estudios han sugerido que la ratio AUC/CMI es mejor para predecir el éxito que la ratio  $C_{\max}/CMI_{90}$  (Deziel et al., 2001). También hay que tener en cuenta el tiempo transcurrido entre dosis, si este tiempo va más allá de 24 horas (como en el caso del gemifloxacino), la efectividad puede depender del tiempo en que la concentración de fármaco excede de la CMI ( $T > CMI$ ) (MacGowan et al., 2001).

Cuando no es posible una ratio  $C_{\max}/CMI_{90} > 8$ , la importancia del tiempo de exposición al fármaco es mayor, y la eficacia dependerá de la ratio AUC/CMI. La ratio AUC/CMI también sirve como índice PK/PD cuando la infección está provocada por bacterias de crecimiento lento, cuando existe poco o nulo PAE, o cuando las CMI de los microorganismos son bajas.

Gran cantidad de estudios en modelos animales (basados en infecciones causadas por Gram-negativos) han mostrado que un valor de AUC/CMI de 100 o mayor, es necesario para asegurar su supervivencia (Craig, 1998; Craig y Dalhoff, 1998; Thomas et al., 1998). Este valor de 100, si lo trasladamos a concentración de fármaco, equivale aproximadamente a 4 veces la CMI a lo largo de un intervalo de 24 horas de dosificación (concentraciones *in vitro* de difloxacino necesarias para asegurar el efecto bactericida contra cepas aisladas en perros que padecen infección recurrente del tracto urinario; Walker, 2000). La ratio AUC/CMI tiene una gran importancia en el resultado clínico observado con moxifloxacino (Vesga et al., 1996), ciprofloxacino (Forrest et al., 1993) y grepafloxacino (Forrest et al., 1997).

Diversos estudios han publicado que los valores de AUC/CMI necesarios para asegurar el éxito terapéutico son diferentes para infecciones causadas por Gram-negativos y Gram-positivos. Para organismos Gram-negativos, el valor de AUC/CMI necesario para asegurar la cura y la prevención de cepas resistentes es de 100-125 (Forrest et al., 1993). En contraste, la ratio AUC/CMI para bacterias Gram-positivas es considerablemente menor, aproximadamente 30-50 (Ibrahim et al., 2002; Preston et al., 1998; Wright et al., 2000). Investigaciones con fluoroquinolonas de tercera generación han sugerido que, en microorganismos Gram-positivos, los valores de AUC/CMI son substancialmente menores cuando  $C_{\max}/CMI \geq 10$  (Nightingale et al., 2000). Además, Lees y Shojaee Aliabadi (2002) han realizado investigaciones de la ratio AUC/CMI obteniendo un efecto bacteriostático, bactericida y eliminación total bacteriana con varias fluoroquinolonas. En todos los casos, este índice fue menor de 100-125 para terneros, ovejas, cabras y camellos.

Por tanto, la integración PK/PD es una guía para obtener estimaciones iniciales de dosis, que son necesarias para alcanzar la respuesta clínica deseada, modificar un régimen de dosificación en pacientes que tienen alterado el aclaramiento, o para calcular una dosis basándose en la información de la susceptibilidad de organismos patógenos.

Sin embargo, no es correcto usar estos índices para asegurar la efectividad de un producto o para comparar productos. Hay numerosos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos que no pueden predecirse. Por ejemplo, la concentración sérica de un fármaco no necesariamente refleja la capacidad de este para penetrar en el sitio de infección o en el interior de la célula bacteriana.

La actividad bactericida de un antibiótico puede alterarse por modificaciones en la relación pH intracelular/pKa del fármaco, contenido en oxígeno, y actividad enzimática intracelular (Butts, 1994). Además, la potencia de un antibiótico es frecuentemente considerada en términos de CMI, que es un efecto estático sobre el crecimiento bacteriano. La CMI de un antibiótico puede no ser igual que su concentración bactericida mínima (CBM ó MBC). Desde el momento que los valores de CMI y CBM de un antibiótico son estimados *in vitro*, estos no reflejan la capacidad antimicrobiana *in vivo* por numerosos factores (Craig y Dalhoff, 1998). Mientras que se ha demostrado que algunas fluoroquinolonas tienen actividad *in vitro* e *in vivo* contra bacterias en fase estacionaria (p.e., ofloxacino y ciprofloxacino), otras no (p.e., norfloxacino) (Lode et al., 1998). También tenemos que tener en cuenta que una vez que hemos alcanzado un determinado valor de la ratio AUC/CMI o  $C_{\max}/CMI$  para un determinado antibiótico, el incremento de

estas ratios no aumenta su eficacia clínica, ya que elevadas concentraciones de fluoroquinolonas inhiben la síntesis de ARN y la síntesis proteica, provocando una disminución en su actividad bactericida (Lode et al., 1998).

Últimamente, diversos estudios indican que la integridad de la respuesta inmune del animal, determinará la efectividad de la integración PK/PD (Andes y Craig, 2002; Toutain et al., 2002).

## **2.6. Toxicidad e interacciones medicamentosas**

La toxicidad de una fluoroquinolona depende de la dosis y la especie de animal de destino (Bertino y Fish, 2000). Muchas reacciones son consideradas menores y reversibles en tratamientos discontinuos. En Medicina humana, han sido descritas reacciones de fotosensibilidad, interacciones medicamentosas, efectos sobre el sistema nervioso central (ataxia, crisis epiléptica, desvanecimiento, insomnio, somnolencia y temores) y cristaluria (conduciendo a una uropatía obstructiva). Muchos de los efectos tóxicos anteriores han sido descritos también en perro y gato. Además, en Medicina Veterinaria se han descrito alteraciones gastrointestinales (como náuseas, vómitos y diarrea), artropatías en animales jóvenes y toxicidad ocular (degeneración retiniana en gatos y cataratas subcapsulares).

Algunas fluoroquinolonas inducen una prolongación del intervalo QT en personas sensibles (Cubeddu, 2003) y, en personas con alto riesgo, pueden provocar arritmias (Owens y Ambrose, 2002a,b). Similarmente, ha sido descrito una prolongación de este intervalo en perros, tras la administración de altas dosis de fluoroquinolonas como esparfloxacino (Satoh et al., 2000). Otras quinolonas no aprobadas para uso veterinario, como moxifloxacino y gatifloxacino, han sido asociadas con una prolongación de la repolarización cardíaca (en modelos caninos) (Chiba et al., 2000).

Tendinitis y rupturas espontáneas de tendón han sido descritas en personas, durante o tras una terapia con quinolonas. El efecto del enrofloxacino sobre un cultivo de células de tendón de caballos, adultos y juveniles, ha sido investigado por Yoon et al., 2004. Enrofloxacino inhibe la proliferación celular, induce cambios morfológicos, disminuye el contenido total de monosacáridos, y altera la síntesis de proteoglicanos en este tipo de cultivos celulares. Estos efectos son más pronunciados en cultivos celulares de animales jóvenes que en adultos.

Las interacciones medicamentosas que pueden ocurrir, también deben ser tenidas en cuenta. Las siguientes interacciones han sido estudiadas en humanos, y pueden ser relevantes en especies del ámbito veterinario:

1. Ciprofloxacino y teofilina (Radandt et al., 1992): Esta interacción resulta del metabolismo de las fluoroquinolonas por la isoenzima 1A2 del sistema citocromo P450. Las fluoroquinolonas inhiben esta enzima previniendo el metabolismo/inactivación de las metilxantinas, como cafeína y teofilina, provocando exceso de estas sustancias en el sistema nervioso central y estimulación cardíaca. Esta interacción puede ser interesante en medicina veterinaria ya que ciprofloxacino es un metabolito de enrofloxacina.

2. Probenecid puede disminuir el aclaramiento renal de las fluoroquinolonas (Aminimanizani et al., 2001).

3. Para minimizar el riesgo de prolongación del intervalo QT y arritmias, las fluoroquinolonas no deben co-administrarse con fármacos que prolonguen dicho intervalo, como eritromicina, disopiramida, o antidepresivos como amitriptilina (Curtis et al., 2003; Owens y Ambrose, 2002a,b).

## 2.7. Resistencias bacterianas

El desarrollo de resistencias a las fluoroquinolonas mediante mutaciones en las topoisomerasas ha sido estudiado ampliamente. La mutación se produce principalmente sobre la ADN-girasa (topoisomerasa II) (Nakamura et al., 1989; Yoshida et al., 1990), y secundariamente sobre la topoisomerasa IV, contribuyendo a mayores niveles de resistencia (Vila et al., 1996). Substituciones en aminoácidos en un sub-dominio específico de las topoisomerasas, llamado “región determinante de resistencia a las quinolonas” (QRDR) dentro de la subunidad *gyrA* (Yoshida et al., 1988, 1990) y *parC* (Khodursky et al., 1995) dan lugar a resistencias bacterianas.

En *E. coli*, la mayoría de las mutaciones asociadas con la resistencia a quinolonas, ocurren en la región QRDR a nivel de la serina 83 (Ser83) y aspartato 87 de la subunidad *gyrA*, y en la serina 79 y aspartato 83 de la subunidad *parC*, y en análogos lugares en otras especies (Bebear et al., 2003; Takiff et al., 1994; Taylor y Chau, 1997).

El análisis de las secuencias de ADN de los genes de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* mostraron que esta situación es diferente en Gram-positivos, ya que el blanco de acción de las fluoroquinolonas es la topoisomerasa IV (codificada por *grlA* y

grlB) (Muñoz y De La Campa, 1996; Ng et al., 1996). En ambos casos, las mutaciones provocan una disminución en la afinidad de las quinolonas por el complejo enzima/ADN (Maxwell y Crithlow, 1998), y permiten la replicación del ADN en presencia de concentraciones de fármaco que serían bactericidas para microorganismos sin mutación.

En bacterias Gram-negativas, la resistencia a quinolonas se desarrolla normalmente de forma gradual. Una única mutación en la región QRDR, generalmente en posición Ser83, confiere resistencia al ácido nalidíxico y disminuye la susceptibilidad a las fluoroquinolonas (las CMI de ciprofloxacino pasan de 0.015-0.03 µg/mL a 0.125-1 µg/mL tras esta primera mutación). Si ocurre una segunda mutación en la región QRDR de la subunidad gyrA, la resistencia a las fluoroquinolonas es evidente (CMI de ciprofloxacino  $\geq 4$  µg/mL). Sin embargo, esto no ocurre así en todas las bacterias Gram-negativas. En *Campylobacter*, bacterias que carecen de la topoisomerasa IV, una simple mutación en la subunidad gyrA es suficiente para alcanzar elevadas CMI de ciprofloxacino (32 µg/mL) (Wang et al., 1993). Esta característica ayuda a explicar la mayor prevalencia de resistencias en *Campylobacter*, que en *E. coli*, en animales de abasto expuestos a fluoroquinolonas (Van Boven et al., 2003).

Además de las mutaciones estructurales en los genes de las topoisomerasas, la resistencia a fluoroquinolonas se puede producir por una disminución en la permeabilidad de la pared bacteriana o una alteración en la actividad de las bombas de eflujo energía-dependiente. La resistencia a las fluoroquinolonas producida por mutaciones conlleva una disminución de la susceptibilidad o resistencia a esta clase de antibióticos, tanto a quinolonas de humana como de veterinaria (Everett et al., 1996; Piddock et al., 1998). Sin embargo, las resistencias producidas por una disminución de la permeabilidad o alteración de las bombas de eflujo, son menos específicas, generando múltiples resistencias cruzadas a otros antibióticos no relacionados estructuralmente, como cefemas, penemas y tetraciclinas (Poole, 2000).

Parece ser que la mayoría de las fluoroquinolonas cruzan la membrana externa de las bacterias Gram-negativas a través de unas proteínas llamadas porinas (Nikaido y Vaara, 1985), aunque algunas pueden difundir a través de la bicapa lipídica. Por tanto, el número y tamaño de las porinas puede contribuir a la susceptibilidad de las bacterias a estos agentes. Las resistencias debidas a un menor ingreso de quinolonas en el interior bacteriano se reflejan en una menor susceptibilidad y pueden contribuir a la existencia de diferencias de potencia entre los derivados quinolónicos. La deficiencia de porinas ha sido

asociada con la resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* y *Pseudomonas*. Por ejemplo, mutaciones en la porina OmpF de *E. coli* aumenta el doble la CMI. (Alekhun y Levy, 1999).

Los cambios en la permeabilidad mediados por alteración de las porinas son frecuentemente parte de una respuesta celular coordinada a la presencia de numerosos agentes tóxicos, causando una regulación del flujo de sustancias. Este mecanismo disminuye la susceptibilidad de un amplio número de antimicrobianos, además de las fluoroquinolonas.

En el sistema de eflujo de antibióticos, las proteínas localizadas en la membrana bombean el fármaco desde el interior celular al exterior, antes de que dichos antibióticos puedan interactuar en el sitio activo de la ADN-girasa. El genoma de *E. coli* codifica más de 30 bombas de eflujo, muchas de las cuales median en el flujo de antimicrobianos. Algunas son efectivas para sustancias específicas, otras protegen contra una gran variedad de componentes, estructuralmente muy diferentes. Además, una sola bacteria puede contener múltiples bombas de eflujo (p.e., AcrAB y cmlA) que son capaces de expulsar el mismo agente antimicrobiano. Este eflujo, constitutivo e inducible, es un mecanismo conocido de creación de resistencias a las fluoroquinolonas en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y puede ser más importante que la mutación secundaria en los genes que codifican la topoisomerasa IV. Por ejemplo, se ha demostrado que la eliminación del gen AcrAB que codifica una bomba de eflujo, reduce las CMIs de ciprofloxacino en bacterias con mutación de la enzima topoisomerasa, a los niveles anteriores a dicha mutación (Oethinger et al., 2000).

Recientemente, un gen (*qnr*) mediador de la resistencia a quinolonas ha sido descrito en un plásmido, primero en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Martínez-Martínez et al., 1998) y más tarde en *E. coli* (Jacoby et al., 2003; Wang et al., 2003). El gen está localizado cerca de secuencias asociadas con la clase I de Integrones. De una forma concentración –dependiente, *qnr* actúa protegiendo la ADN-girasa de *E. coli*, pero no la topoisomerasa IV, de la inhibición de ciprofloxacino (Tran y Jacoby, 2002). El gen *qnr* provoca una disminución de la susceptibilidad a las bacterias que lo poseen (*qnr*<sup>+</sup>), pero siguen considerándose clínicamente susceptibles. Se ha sugerido que el impacto sobre la resistencia clínica depende de la capacidad de *qnr* para permitir la selección de mutantes a concentraciones que normalmente serían tóxicas para las bacterias (Martínez-Martínez et al., 1998).

Cada uno de los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas puede ocurrir simultáneamente en la misma célula, conduciendo a elevados niveles de resistencia. Hasta la fecha, no han sido descubiertos mecanismos basados en la modificación/inactivación enzimática de las quinolonas, ya que estas son antibióticos sintéticos que no tienen análogos naturales, y por tanto, es menos común que aparezca este tipo de mecanismo.



### **3.- OBJETIVOS**

En Medicina veterinaria se han registrado varias fluoroquinolonas de 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> generación, en su mayor parte destinadas a animales de compañía, porcino y bovino. Por ello resulta interesante comprobar su aplicación, desde el punto de vista farmacocinético, en otras especies como pequeños rumiantes, equino y conejos. Por otro lado el desarrollo de nuevas fluoroquinolonas en Medicina humana, hace que sea interesante estudiar su comportamiento en animales por su potencial aplicación en el ámbito de la veterinaria. Por tanto, el presente estudio se ha planteado con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Establecer los parámetros farmacocinéticos de difloxacino y danofloxacino tras su administración intravenosa, intramuscular y subcutánea a caballos.
2. Establecer los parámetros farmacocinéticos en plasma, y la penetración y perfil cinético en leche de ibafloxacino, difloxacino y orbifloxacino tras su administración por diferentes vías, a cabras en periodo de lactación.
3. Estudiar la farmacocinética de difloxacino en ovejas tras su administración intravenosa, intramuscular y subcutánea.
4. Desarrollo de un método simple, rápido y sensible para la cuantificación de ibafloxacino en plasma de conejo, usando un HPLC con detector de fluorescencia.
5. Establecer los parámetros farmacocinéticos de ibafloxacino, danofloxacino, moxifloxacino y orbifloxacino en conejos tras su administración por diferentes vías, y evaluación de una formulación de liberación sostenida de moxifloxacino administrada por vía subcutánea.
6. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de danofloxacino y orbifloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de conejos procedentes de granjas comerciales, y establecimiento de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos de dichos fármacos utilizando las CMIs calculadas.

## **4.- INTRODUCTION**

Bacterial infectious diseases constitute a broad problem in Veterinary Medicine concerning to companion, production, sport and wild animal species. The damage caused by them is difficult to evaluate economically. It is possible to assess the expense due to medication, honorarium of the veterinarian and falls of the animals, but it is more complex (not impossible) to value the losses for inadequate or void production, for badly sport performance or, simply for the sentimental loss that it could suppose for the owner.

The use of antibiotics is necessary, and due to the diversity of pathogenic microorganisms, some of them intracellular, it is necessary to have suitable antibiotics.

Fluoroquinolones are bactericidal antibiotics with an excellent activity against a wide range of aerobic bacteria and mycoplasma (Giles et al., 1991; Hannan et al., 1997; Appelbaum and Hunter, 2000). Due to their low percentages of plasma protein binding, they have high volumes of distribution and good penetration in cells and tissues of mammals. Therefore fluoroquinolones are valuable agents for the treatment of infections caused by intracellular bacteria (Hooper, 1998). They are useful in the treatment of infections localized in the respiratory tract and soft tissues, and probably in the treatment of mastitis. On the other hand, there is a great interest from the pharmaceutical industry, farmers and veterinarians for having new available fluoroquinolones.

Knowledge of basal pharmacokinetics of fluoroquinolones in healthy animals is the first step to evaluate in a precise form if their use in the above-mentioned species can be possible or not. Known the pharmacokinetic parameters, which would give information on the specific disposition and elimination processes, if they are ideal, it is necessary to carry out an integrated study including pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) parameters. With the PK/PD study it is possible to establish dose regimens with an ideal therapeutic dose–efficacy ratio. Finally, these dosage regimens will have to be evaluated, as for efficacy, in clinical controlled trials.

The pharmacokinetic behaviour of a certain drug can vary in the different animal species, even nearby phylogenetically (Escudero et al., 1999), due to morphologic and physiological differences: digestive tract, hepatic functionality, renal functionality, cardiac pace, and so on. It forces to avoid the extrapolations of dosages from one species to another, as far as possible. For this reason, it is necessary to study the pharmacokinetic behaviour of every drug in the species in which it will be applied.

The objective of pharmacokinetics consists of studying the temporary evolution of the concentrations and quantities of drug and its metabolites in organic fluids, tissues and excrements, as well as its pharmacological response, in order to obtain adapted models to interpret the resultant information. The information is tried using mathematical models to which the concentrations, the quantities of drug or its metabolites in the total of the body or in someone of its parts are adjusted. The equations obtained serve to formulate predictions of the results that would be obtained in drug treatments, since the pharmacological response comes determined by the quantity of drug that reach the places of action, and this access is determined by drug blood concentration.

In animal species of food production, antibiotics are, undoubtedly, drugs used very frequently, almost systematically. From it, there is a series of circumstances, among which we can stand out:

- The total costs of treatment, which suppose an increase in the expenses of production. In this respect, due to the fact that the net performance is minor, we have to try that these expenses are minimal, without diminishing the efficiency of the treatment.

- The maintenance of effective levels of drug is very important in any type of treatment, but with antibiotics it is, in addition, essential, since if this condition is not observed, it can produce bacterial resistances. Moreover, it can produce minor or null efficiency of the treatment and the unnecessary increase of costs of production.

- Other relevant aspect, is to avoid the presence of residues in animal products intended for human consumption.

All of these circunstances have led us to investigate the pharmacokinetics of various antibiotics of this group in species of veterinary interest. Some of these drugs are registered for its use in animal species and others for using in human medicine.

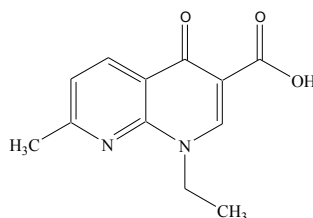
## **5.- BIBLIOGRAPHICAL REVIEW**

### 5.1. Chemical structure and classification

Quinolones, also referred to as 4-quinolones, quinolone carboxylic acids and fluoroquinolones, comprise a large and expanding group of synthetic antimicrobial agents. The first drug of this class, nalidixic acid, was discovered in 1962 and was a modification of a compound isolated during the production of the anti-malaria drug, chloroquine. Its absorption and distribution were limited, and its antibacterial spectrum was restricted to *Enterobacteraceae*, so this drug was only effective for the treatment of urinary tract infections. In 1980, the addition both of a fluorine molecule at the 6-position of the basic quinolone structure and a piperazine substitution at the 7-position was found to enhance quinolone antibacterial activity, gaining effectiveness against such organisms as *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive cocci, and to increase the extent of oral drug absorption and tissue distribution (Ball, 2000; Martinez et al., 2006). Products with this fluorine molecule are known as fluoroquinolones.

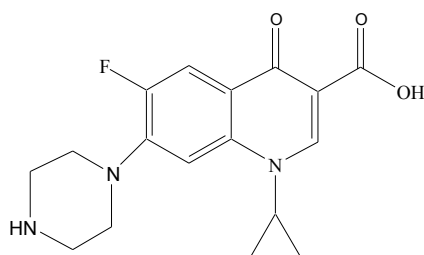
Generally speaking, quinolones may be classified into one of three generations:

1. **First generation:** comprises the original quinolone compounds such as nalidixic acid, oxolinic acid, pipemidic acid and cinoxacin. These molecules were associated with poor oral bioavailability, limited distribution into systemic tissues, and a spectrum of activity limited to *Escherichia coli* and several other Gram-negative organisms.



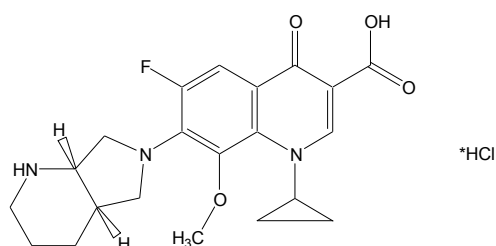
Nalidixic acid

2. **Second generation:** the first of the fluoroquinolones, were developed in the 1980s, exhibited increased antibacterial activity against the Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria (such as *P. aeruginosa*), and had some activity against certain Gram-positive cocci. Structural changes associated with the second generation increased their oral bioavailability and systemic distribution. Quinolones fitting into this category include entities such as norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin and marbofloxacin.



Ciprofloxacin

3. **Third generation:** maintained the favorable characteristics of the second generation drugs while exhibiting increased activity against Gram-positive bacteria, anaerobes and mycobacteria. These compounds also exhibited excellent oral bioavailability and were associated with a prolonged terminal elimination half-life. The third generation fluoroquinolones have lower central nervous system toxicities and exhibit fewer interactions with the cytochrome P450 (CYP 450) system (Ball, 2000; Martinez et al., 2006). This group mainly consists of orbifloxacin, levofloxacin, esparfloxacin, moxifloxacin, grepafloxacin and gatifloxacin.



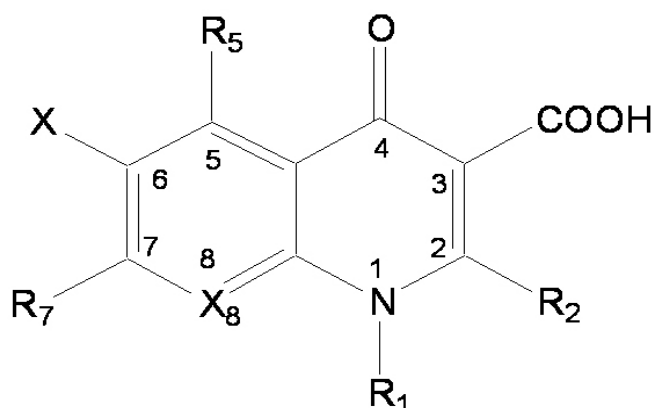
Moxifloxacin

## 5.2. Structure-activity relationship

Following the discovery of the therapeutic effects of nalidixic acid, chemists began to probe every position within the quinolone nucleus in an attempt to improve potency, broaden the spectrum of antibacterial activity, and reduce recognized side effects. To date, several thousand of related compounds have been synthesized. Some studies have shown that there are four components of the 4-quinolone nucleus that, when manipulated, can enhance the antibacterial activity of the quinolone nucleus. These include an ethyl group at the N-1 position, a carboxylic group at C-3, an oxygen atom at C-4 and a fluorine atom at



C-6. Of these, it was the addition of a fluorine atom to the 4-quinolone ring at the 6-position that has substantially widened the antibacterial activity spectrum of the quinolones (Wright et al., 2000). This modification also enhanced the quinolone's oral bioavailability and tissue penetration. As a result of this discovery, all of the 4-quinolones marketed for clinical use today are halogenated at the 6-position. Some are also halogenated at the 8-position.



### 5.3 Mechanism of action

Early biochemical evidence indicated that fluoroquinolones damage bacterial DNA and lead to defects in negative supercoiling (Gellert et al., 1977). This effect was linked to inhibition of DNA gyrase activity.

The active holoenzyme is a heterotetramer composed of two subunits each of *gyrA* and *gyrB* ( $A_2B_2$ ). *GyrA* binds to DNA and mediates strand breakage and rejoining activity, whereas *gyrB* contains the ATP binding site. *GyrA* activity involves cleavage of both DNA strands, (mediated by an enzyme-DNA covalent intermediate), passage of DNA through the break and re-ligation of the strand. In vivo, this process results in two negative supercoils and the hydrolysis of ATP. The topoisomerase IV enzyme, encoded by *parC/parE*, is a secondary fluoroquinolone target. This enzyme is also a multimeric protein composed of two *parC* subunits and two *parE* subunits, which exhibit sequence homology to *gyrA* and *gyrB*, respectively. This enzyme mediates relaxation of duplex DNA and the unlinking of daughter chromosomes following replication (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995).

When susceptible DNA gyrase is exposed to a quinolone, the drug interacts at the surface of an alpha-helical domain of the enzyme involved in DNA cleavage and re-ligation, termed the *quinolone resistance determining region* (QRDR). The toxic effects result from the irreversible formation of a trapped intermediate consisting of quinolone, gyrase and cleaved DNA (Gellert et al., 1977). This prevents progression of replication forks and transcription complexes (Willmott et al., 1994), leading to fragmentation of the chromosome and cell death.

The effect of fluoroquinolones on bacterial proliferation suggests three mechanisms of cell killing (Guthrie et al., 2004; Maxwell and Critchlow, 1998):

1. Mechanism A: common to all quinolones. This requires RNA and protein synthesis and is only effective against dividing bacteria. Mechanism A appears to involve the blocking of replication by the gyrase–quinolone complex on DNA.
2. Mechanism B: does not require RNA and protein synthesis and can act on bacteria that are unable to multiply. Mechanism B can be correlated with dislocation of the gyrase subunits that constrain the ternary complex.
3. Mechanism C: requires RNA and protein synthesis but does not require cell division. Mechanism C may correlate with trapping of topoisomerase IV complexes on DNA.

The fluoroquinolones, as with the penicillins, exhibit a paradoxical effect. Survival curves show that when the fluoroquinolone concentration is near the minimal inhibitory concentrations (MIC) of the bacterium, the drug has a static effect on bacterial growth (bacteriostatic). As the drug concentration increases relative to the MIC of the bacterium, bacterial killing increases up to a certain drug concentration (termed the optimum bactericidal concentration). As concentrations exceed the optimum bactericidal concentration, further increases in drug concentration can lead to a decrease in bacterial killing. Initially, these concentration-related differences in drug effect may be associated with the difference between concentrations needed to inhibit DNA supercoiling versus those needed to inhibit bacterial growth. In general, it appears that the supercoiling reaction of gyrase is less sensitive to the drugs than is bacterial growth by one or two orders of magnitude (Guthrie et al., 2004; Maxwell and Critchlow, 1998).

#### **5.4. Pharmacokinetics**

Pharmacokinetic and physicochemical properties of a drug are particularly important to choose the dose of an antibiotic, when some of these process happen:

1. Hepatic or renal function is altered in the animal. In this case, clearance can be compromised, leading to higher systemic drug concentrations, that can affect product safety.
2. The infection is associated with a purulent discharge or is in a region that may not be highly accessible to the compound.
3. The susceptibility of the pathogen is unknown or the pathogen susceptibility is classified as **intermediate** based upon Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria.
4. Dosing conditions (e.g., food effects), may affect drug bioavailability and so the level of systemic drug exposure.
5. If there is concomitant drug use, it can result in potential drug-drug interactions.
6. If the animal is infected with a highly virulent bacterial strain or the host presents compromised immune function (e.g., geriatric animals or animals on corticosteroid therapy).
7. When developing prudent use practices to limit the likelihood of resistance development.

Therefore, we will analyze general pharmacokinetic properties of fluoroquinolones.

##### **5.4.1. Bioavailability**

Although there is important individual variation among the different quinolones and the different animal species, as a rule, the fluoroquinolones are rapidly absorbed following oral administration in monogastric species. With ruminants, systemic concentrations of orally administered fluoroquinolones are below therapeutic levels. For example, the oral bioavailability of enrofloxacin is only 10% in adult ruminants as compared to greater than 80% oral bioavailability in monogastric species (Greene and Budsberg, 1993; Vancutsem et al., 1990).

In general, unless administered with food containing a high concentration of divalent cations, the postprandial oral administration of fluoroquinolones does not result in

clinically significant decreases in bioavailability. However, for lipophilic compounds, food can significantly enhance oral bioavailability and therefore increase systemic drug concentrations. For example, food significantly increases the AUC and  $C_{\max}$  of ibafloxacin when administered to cats (Coulet et al., 2005).

While the lipophilicity of these molecules promotes absorption by passive diffusion, non-passive mechanisms for intestinal uptake also may exist (Dautrey et al., 1999; Rabbaa et al., 1997). Carrier-mediated transport across the apical membrane, as it is seen with sparfloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin, has been reported (Griffiths et al., 1994; Rabbaa et al., 1997). It is critical that the product is fully dissolved by the time that the dosage form reaches the absorbing segment of the small intestine. If this is not the case, poor oral bioavailability and lower than expected systemic drug concentrations may occur. In addition, transporter saturation and competitive transporter binding (by other molecules) may occur (Griffiths et al., 1994).

Intestinal transporters may also be an important mechanism of drug elimination, resulting in the active secretion of drug from the blood back into the intestine. Such transporter mechanisms have been described for a variety of compounds, including ciprofloxacin, norfloxacin and perfloxacin (Dautrey et al., 1999; Griffiths et al., 1994). Moreover, this intestinal secretion may involve different transporters for different fluoroquinolones. For example, while sparfloxacin is a P-glycoprotein substrate, ciprofloxacin transport may be mediated by organic anion and/or cation transporters (Dautrey et al., 1999).

#### **5.4.2. Protein binding and tissue distribution**

The *in vivo* activity of an antimicrobial agent, as well as the drug's ability to transfer from blood to tissue, is dependent on the free concentration of the drug. Therefore, when using pharmacokinetic and pharmacodynamic principles to evaluate an appropriate fluoroquinolone dose, it is critical that assessments have to be made on the basis of free rather than total drug concentrations (Bergogne-Berezin, 2002; Craig and Ebert, 1989; Drusano, 2002). In this regard, it is also important to note that *in vitro* MIC values are determined on the basis of free (unbound) drug concentrations. Unfortunately, within the veterinary literature, there is little consideration given to free drug concentrations, and most pharmacokinetic studies report exposure metrics (e.g., area under the curve, AUC, and maximum observed concentration,  $C_{\max}$ ) for total drug concentrations.

Potential barriers may influence diffusion of the drug to the site of infection, leading to discrepancies between free serum concentrations and bacterial drug exposure. Examples of such barriers include formed abscesses, the blood–brain barrier, bacterial biofilms and inflammation debris (Costerton et al., 1999; Toutain et al., 2002). For this reason, understanding the host response to a particular type of infectious agent will greatly facilitate efforts to develop and use pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships for dose optimization. Similarly, understanding the binding characteristics of the drug and its ability to diffuse across biological barriers will help clinicians to define an appropriate therapeutic moiety.

Fluoroquinolones are characteristically associated with high volumes of distribution in excess of 1.0 L/kg (Aminimanizani et al., 2001; Lode et al., 1998). When considering these values, it is important to recognize that compartmental fluid volumes are actually: 0.05 L/kg for plasma, 0.2 L/kg for extracellular fluids and 0.7 L/kg for total body water (Wamberg et al., 2002). Volumes in excess of 0.7 L/kg indicate that a drug is binding preferentially to tissues, may or may not be available for activity, and may have been sequestered into cells.

Nevertheless, when considering free interstitial drug concentrations, investigators confirmed that unbound concentrations of fluoroquinolones in interstitial fluids are comparable to the free drug concentrations in venous plasma (Araki et al., 1997). Therefore, excluding those situations associated with ion trapping, since equilibrium is established between blood and tissue free drug concentrations (Muller et al., 1999), tissue free drug concentrations can be predicted on the basis of free drug concentrations in the plasma, even in cases where there is nonlinear protein binding (Kovar et al., 1997).

#### **5.4.3. Clearance and elimination**

Fluoroquinolones are frequently categorized by their primary pathway of elimination (Karablut and Drusano, 1993):

1. Elimination via renal mechanisms: enrofloxacin, orbifloxacin, ofloxacin, temafloxacin and lomefloxacin.
2. Hepatic metabolism: difloxacin and perfloxacin.
3. Both renal and hepatic mechanisms: marbofloxacin, danofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin.

The extent to which the fluoroquinolones undergo hepatic metabolism varies greatly between molecules and animal species, with a corresponding wide range in terminal elimination half-life (Greene and Budsberg, 1993; Nix and Schentag, 1998; Vancutsem et al., 1990). Fluoroquinolone metabolic pathways include glucuronidation (cinafloxacin, grepafloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin) or N-oxidation and desmethylation (levofloxacin and sparfloxacin). Generally, metabolism involves the CYP 450 system (Bergogne-Berezin, 2002).

As previously stated, one mechanism of fluoroquinolone elimination is via active drug secretion across the intestinal membrane. Intestinal concentrations can also be a function of biliary secretion. The presence of enterohepatic recirculation can increase the residence time of a compound. For example, in beagle dogs, 80% of an intravenous dose of difloxacin is eliminated in the feces (Federal Register, 1998). This was largely attributable to biliary secretion. Approximately 72–80% of the drug in the bile was the ester glucuronide, with only 6–9% being the parent compound. The glucuronide appears to be hydrolyzed in the gut, thereby restoring the parent compound which was subsequently available for re-absorption. The terminal elimination half-life of difloxacin following oral administration to dogs is approximately 9.4 h.

The extent of renal elimination varies across the fluoroquinolones. Levofloxacin and gatifloxacin are eliminated primarily by the kidney, with the renal clearance of levofloxacin exceeding creatinine clearance by approximately 60%. This suggests the involvement of both glomerular filtration and tubular secretion (Okazaki et al., 1991).

#### **5.4.4. Penetration into milk**

Mastitis is a relevant problem in caprine, ovine and bovine production not only for the economic losses to producers, but also for the hygienic production and the safety of dairy products intended for human consumption. Usually fluoroquinolones are distributed widely into the udder. The disposition of drugs differs depending on animal species. For goats, dosing regimens are normally extrapolated from sheep and cow data. Therefore inappropriate low doses can lead to ineffective therapeutic blood or milk levels and increase the risk of appearance of resistant microorganisms. Equally, toxicity may result if the extrapolated dose is too high.

Then it is important to investigate the specific disposition of fluoroquinolones in goats and particularly its elimination in milk, for a potential therapeutic use in mastitic infections.

Mastitis produces physical and chemical changes both in the milk and the mammary gland itself that can potentially alter the distribution of drugs. Inflammation of the mammary gland leads to vascular permeability changes and differences in milk composition: milk pH generally increases, milk casein concentrations decrease, milk albumin concentrations increase, somatic cells increase and milk fat levels can decrease. All of these factors have the potential to impact on the pharmacokinetics of drugs; however, their exact importance is not well understood (Gehring and Smith, 2006). For example, the article of Fang and Pyörälä (1996) showed that normal milk reduced the activity of enrofloxacin against *E. coli* strains only by a factor of 2, but maintain similar activity in mastitic milk.

#### 5.4.5. Interspecies differences

There are marked interspecies differences in fluoroquinolone pharmacokinetics. For example, the systemic clearance (CL) of difloxacin is substantially lower in pigs (0.16 L/kg/h) than in chickens (0.72 L/kg/h). However, chickens have a substantially larger steady-state volume of distribution ( $V_{ss} = 3.06$  L/kg) compared to pigs (1.7 L/kg) (Inui et al., 1998). Nevertheless, owing to its more rapid CL, the terminal elimination half-life following an intravenous dose in chickens (4.1 h) is faster than that associated with swine ( $T_{1/2} = 7.92$  h). After oral administration, difloxacin bioavailability was similar across the two species: 93.7% and 86.9% for swine and chickens, respectively.

Moxifloxacin pharmacokinetics were compared across six mammalian species: dog, mini-pig, mouse, monkey, human and rat (Siefert et al., 1999). Data of bioavailability ( $F$ ), terminal elimination half-life ( $T_{1/2\lambda z}$ ) and plasma protein binding (%  $f$ ) of the above-mentioned species after oral administration of moxifloxacin are provided in the following table:

Species	F (%)	$T_{1/2\lambda z}$ (h)	% f
Mouse	78	0.93	31
Rate	78	1.2	37
Monkey	52	6.9	38
Dog	91	8.6	29
Minipig	54	5.7	37
Human	82	13	45

Cox et al. (2004) examined the allometric relationship for CL and  $V_{ss}$  following ciprofloxacin administration across a variety of mammalian species (including cow, pig, sheep, dog, rat, monkey, goat, buffalo and humans), and reported the following estimations:

$$CL = 20.6 \text{ (mL/min)} \times BW^{0.815} \text{ (body weight)}, r = 0.95,$$

$$V_{ss} = 3.5 \text{ (L)} \times BW^{0.947} \text{ (body weight)}, r = 0.93.$$

In the same study, Cox and colleagues examined the allometric relationship for enrofloxacin. The resulting plot of log weight versus log CL or log  $V_{ss}$  showed substantial scatter. However, even when there are very high values for  $r$ , allometric scaling may not accurately extrapolate CL or  $V_{ss}$  to an unknown animal specie. In particular, large extrapolation errors can occur when trying to predict pharmacokinetic parameters for large species such as horses and cattle. On the other hand, there have been numerous cases, where equations with low values of  $r$  provided highly accurate extrapolations to the unknown animal species (Mahmood, 2001).

In the following table, differences in the terminal elimination half-lives ( $T_{1/2\lambda z}$ ) and bioavailability (F) of fluoroquinolones are also provided (AliAbadi and Lees, 2002,



Carretero et al., 2002, Fernández-Varón et al., 2006a, Greene and Budsberg, 1993, Mann and Frame, 1992, McKellar et al., 1998, Siefert et al., 1999, Waxman et al., 2001):

	<b>Enrofloxacin</b>		<b>Danofloxacin</b>		<b>Marbofloxacin</b>	
	<b>F(PO)</b>	<b>Terminal <math>T_{1/2}</math> (h)</b>	<b>F(IM)</b>	<b>Terminal <math>T_{1/2}</math> (h)</b>	<b>F(IM)</b>	<b>Terminal <math>T_{1/2}</math> (h)</b>
Chicken	101	15.6				
Turkey	61	3.9				
Cattle	8	15.4	78	2.9	100	4.2
Pig			76	6.8		
Sheep			95.7	3.35		
Dog	91	4.9				8.6
Horse	60	5.6	88.5	5.36	88	4.7
Goat					100	7.2

### 5.5. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships (PK/PD)

The relationship between the pharmacokinetics and microbiological activity (pharmacodynamics) of the fluoroquinolones may be used to determine the dose needed to achieve a desired clinical outcome. From a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) perspective, fluoroquinolones are associated with concentration-dependent killing (Zhanel, 2001).

Parameters attributed to this include the area under the 24-h serum (or plasma) concentration versus time curve ( $AUC_{0-24\text{ h}}$ ) divided by MIC of the clinical isolate ( $AUC/MIC$ ) and the peak serum or plasma concentrations ( $C_{\max}$ ) divided by the MIC ( $C_{\max}/MIC$ ). These parameters are closely related and both are important for ensuring efficacy.

$C_{\max}/MIC$  ratios may be particularly important in the presence of bacteria with higher MIC values or in the presences of rapidly proliferating bacteria (Craig and Dalhoff,

1998). With the latter, rapidly proliferating bacteria have a greater likelihood of undergoing a mutational event that could lead to the genesis of a less susceptible population. In infectious disease processes where there is a high bacterial burden, the risk of a mutational event is increased due simply to the laws of probability (Craig and Dalhoff, 1998; Drusano et al., 1993). Previous investigations have shown that for fluoroquinolones  $C_{\max}/MIC_{90} > 3$  produced 99% reduction in bacterial count and  $C_{\max}/MIC_{90}$  of 8 or greater prevented the emergence of resistant organisms (Craig, 1998). Such ratios ensure increased killing of susceptible organisms, an increased killing or inhibition of organisms with higher MICs and thus, fewer surviving organisms for the host defences to scavenge during the troughs of systemic drug concentrations. High drug concentrations, relative to the MIC, may also contribute to increased post-antibiotic effect (PAE). For those bacteria–drug combinations that exhibit a PAE, *in vivo* PAEs have been shown to be longer than *in vitro* PAEs for most organisms.  $\beta$ -haemolytic streptococci are notable exceptions. Thus, optimizing the  $C_{\max}$  to MIC ratio will delay the re-growth of pathogens, sometimes by several hours. The result of using this type of dosing regimen is that there are fewer organisms remaining that can reproduce into a resistant subpopulation.

Despite the large body of information suggesting that fluoroquinolones are highly effective in the presence of high  $C_{\max}/MIC$  values, exceptions to this rule have been observed. For example, in the case of *Bacillus anthracis*, hollow fibre studies suggest that AUC/MIC was more predictive of success as compared to  $C_{\max}/MIC$  (Deziel et al., 2001). If the duration of time between doses is extended beyond 24 h (as was tested for gemifloxacin), effectiveness may also depend upon the duration of time that drug concentrations exceed the MIC ( $T > MIC$ ) (MacGowan et al., 2001).

When a  $C_{\max}/MIC$  ratio of 8 is not possible, the contribution of time of exposure becomes increasingly important and the target for efficacy defaults to the AUC/MIC ratio. AUC/MIC also serves as the pivotal PK/PD index when the infection is caused by relatively slow growing bacteria, when there is little or no PAE that will contribute to bacterial killing, or when the MIC for the pathogen is relatively low. A variety of animal model studies (based on infections caused by Gram-negative organisms) have shown that AUC/MIC values of 100 or greater have been needed to ensure host survival (Craig, 1998; Craig and Dalhoff, 1998; Thomas et al., 1998). This value of 100 translates to drug concentrations equalling approximately four times the MIC throughout the 24-h dosing interval, corresponding to the findings by Walker (2000) (*in vitro* difloxacin concentrations

needed to ensure a bactericidal effect against clinical isolates from dogs presenting with recurrent urinary tract infections). The importance of AUC/MIC is consistent with clinical outcomes observed with moxifloxacin (Vesga et al., 1996), ciprofloxacin (Forrest et al., 1993) and grepafloxacin (Forrest et al., 1997).

Studies report that the AUC/MIC values needed to ensure a successful therapeutic outcome may be different for infections caused by Gram-negative and Gram-positive bacteria. For Gram-negative organisms, the estimated AUC/MIC ratios needed to ensure bacterial cure and prevent the selection of resistant strains is estimated to be approximately 125 (Forrest et al., 1993). In contrast, the AUC/MIC ratio for Gram-positive bacteria is considerably lower, approximately 30–50 for a number of drug–microbe combinations (Ibrahim et al., 2002; Preston et al., 1998; Wright et al., 2000). Studies involving the third and fourth generation fluoroquinolones suggest that for Gram-positive organisms AUC/MIC values are substantially lower when  $C_{\max}$ /MIC values are  $\geq 10$  (Nightingale et al., 2000). Moreover, Lees and Shojaee Aliabadi (2002) have studied in *ex vivo* experiments the ratios of AUC/MIC producing bacteriostasis, bactericidal activity and elimination of bacteria with different fluoroquinolones. In all these cases, the surrogate markers for cattle, sheep, goat and camel were lower than 100-125.

Therefore pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships can serve as a valuable guide for obtaining initial estimates of doses that may be needed to achieve a desired clinical response, to modify a dosing regimen in patients with altered clearance, or to scale a dose based upon susceptibility information on the invading pathogen. However, it is incorrect to use these relationships as a mechanism for either assessing product effectiveness (in lieu of clinical data) or for comparing products. There are numerous factors that pharmacokinetics and pharmacodynamics alone can not accurately predict. For example, serum drug concentrations do not necessarily reflect a compound's ability to diffuse into the site of infection and into the bacterial cell.

Along with concerns about microbial susceptibility patterns, drug's bactericidal activities can vary with the intracellular pH versus drug  $pK_a$ , oxygen content, and intracellular enzymatic activity (Butts, 1994). Moreover, drug potency is often considered in terms of MIC, which is a static effect on microbial growth. The MIC may not be the same as a compound's minimum bactericidal concentration (MBC). Since both the MIC and MBC values are *in vitro* estimates, they do not reflect a drug's rate of killing, the effect of serum on antimicrobial activity, PAE, or post antimicrobial sub-MIC effects (Craig and

Dalhoff, 1998). Moreover, while some fluoroquinolones demonstrate *in vivo* and *in vitro* activity against stationary phase bacteria (e.g., ofloxacin and ciprofloxacin), others (norfloxacin) do not (Lode et al., 1998). In addition, once a certain AUC/MIC or  $C_{\max}$ /MIC ratio is achieved for a particular compound, further increases in these ratios may not improve clinical efficacy. As indicated earlier, at high FQ concentrations, both RNA and protein synthesis can be inhibited, thereby causing a decrease in bactericidal activity (Lode et al., 1998). Ultimately, it is the integrity of the host immune response that will determine the effectiveness of the targeted pharmacokinetic–pharmacodynamic relationship (Andes and Craig, 2002; Toutain et al., 2002).

### 5.6. Toxicities and drug-drug interactions

Fluoroquinolone toxicities are, mainly, dose and animal specie dependent (Bertino and Fish, 2000). Most reactions are considered to be minor and reversible upon discontinuing treatment. In human medicine, there have been reports of photosensitivity, drug–drug interactions, central nervous system effects (including seizures, ataxia, dizziness, insomnia, restlessness, somnolence and tremors), and crystalluria (leading to obstructive uropathy). Many of these toxicities have also been reported in dogs and cats. In addition, in veterinary species, reported toxicities include gastrointestinal disturbances (such as nausea, vomiting and diarrhoea), arthropathies in young animals, especially dogs, and ocular toxicities (including retinal degeneration in cats and subcapsular cataracts for certain fluoroquinolones).

Some fluoroquinolones have been known to induce QT prolongation in sensitive people (Cubeddu, 2003). In a high risk patient, this could lead to Torsades de Pointe (Owens and Ambrose, 2002a, b). Similarly, QTc prolongation following high doses of some fluoroquinolones, such as sparfloxacin, has been reported in dogs (Satoh et al., 2000). Other fluoroquinolones not approved for veterinary use, but which have been associated with prolongation of cardiac repolarisation (canine model), include gatifloxacin and moxifloxacin (Chiba et al., 2000).

Tendonitis and spontaneous tendon rupture have been reported in people during or following therapy with fluoroquinolones. Consequently, the effect of enrofloxacin on tendon cell cultures of mature and juvenile horses has been investigated (Yoon et al., 2004). Enrofloxacin was found to inhibit cell proliferation, induce morphological changes, decrease total monosaccharide content, and alter small proteoglycan synthesis at the

glycosylation level in equine tendon cell cultures. These effects are more pronounced in juvenile than in adult equine tendon cells.

Other reported adverse events have been associated with drug–drug interactions. The following interactions have been reported to occur in humans via mechanisms that may be relevant to veterinary species. Therefore, it may be prudent to approach, with caution, the concomitant use of fluoroquinolones and the following entities:

1. Ciprofloxacin and theophylline (Radandt et al., 1992): These interactions result from fluoroquinolone metabolism by the P450 CYP 1A2 isoenzyme. Fluoroquinolone-mediated inhibition of this enzyme prevents the metabolism/inactivation of methylxanthines such as caffeine and theophylline causing excess CNS and cardiac stimulation. This potential interaction may have veterinary relevance in that ciprofloxacin is a metabolite of enrofloxacin.
2. Probenecid and renal elimination: probenecid may decrease renal clearance of fluoroquinolones (Aminimanizani et al., 2001).
3. Multiple drug effects on cardiac repolarisation: to minimise risk of Q-T prolongation and subsequent Torsades de Pointe, fluoroquinolones should not be co-administered with other Q-T prolonging drugs such as erythromycin, disopyramide, or antidepressants such as amitriptyline (Curtis et al., 2003; Owens y Ambrose, 2002a,b).

### **5.7. Resistances**

The development of fluoroquinolone resistance via mutations in topoisomerases has been extensively studied. Resistance is mediated primarily by target mutations in DNA gyrase (topoisomerase II) (Nakamura et al., 1989; Yoshida et al., 1990), with secondary mutations in topoisomerase IV contributing to higher levels of resistance (Vila et al., 1996). Amino acid substitutions that can result in bacterial resistance have been localized to a specific topoisomerase subdomain termed the quinolone resistance-determining region (QRDR) within *gyrA* (Yoshida et al., 1988, 1990) and *parC* (Khodursky et al., 1995).

In *E. coli*, most mutations associated with quinolone resistance occur in the QRDR at serine 83 (Ser83) and aspartate 87 of *gyrA*, and at serine 79 and aspartate 83 of *parC* and

at analogous sites in other species (Bebear et al., 2003; Takiff et al., 1994; Taylor and Chau, 1997).

DNA sequence analysis of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* genes shows that the situation can be reversed in Gram-positive bacteria, where topoisomerase IV (encoded by *grlA* and *grlB*) is the primary fluoroquinolone target (Muñoz and De La Campa, 1996; Ng et al., 1996). In both cases, mutations decrease the quinolone affinity for the enzyme/DNA complex (Maxwell y Crithlow, 1998), and allow DNA replication to continue in the presence of fluoroquinolone concentrations that are inhibitory to wild-type cell growth.

Among Gram-negative organisms, quinolone resistance typically develops in a stepwise manner. A single QRDR mutation, usually at Ser83, confers resistance to nalidixic acid and decreases susceptibility to fluoroquinolones (ciprofloxacin MICs 0.125–1 µg/mL from a wild-type baseline of 0.015–0.03 µg/mL). Secondary mutations in the *gyrA* QRDR lead to overt fluoroquinolone resistance (ciprofloxacin MICs  $\geq 4$  µg/mL). However, this does not hold true for all Gram-negative bacteria. In *Campylobacter*, which lacks topoisomerase IV, a single mutation in *gyrA* is sufficient to produce high-level ciprofloxacin MICs (32 µg/mL) (Wang et al., 1993). This feature helps to explain the higher prevalence of resistance in *Campylobacter*, compared with *E. coli*, from food animals exposed to fluoroquinolones (Van Boven et al., 2003).

In addition to structural mutations in the topoisomerase genes, fluoroquinolone resistance is mediated by decreased permeability of the bacterial cell wall and by the activity of energy-dependent efflux pumps. Fluoroquinolone resistance due to target mutations typically results in decreased susceptibility or resistance to other members of the class for both veterinary and human drugs (Everett et al., 1996; Piddock et al., 1998). Resistance due to decreased permeability and active efflux often are less specific, generating cross-resistance to multiple classes of antimicrobials (Poole, 2000).

It appears that most fluoroquinolones cross the Gram-negative outer membrane through protein channels called porins (Nikaido and Vaara, 1985), although some may diffuse directly across the lipid bilayer. Thus, the number and size of the porins can contribute to the intrinsic susceptibility of bacteria to quinolone agents. Resistance due to decreased quinolone influx is generally reflected in low-level changes in susceptibility and may help to contribute to differences in potency among different fluoroquinolone derivatives. Porin deficiency has been associated with quinolone resistance in *E. coli* and

*Pseudomonas*. For example, mutations of the *E. coli* porin OmpF produced about a 2-fold increase in quinolone MICs (Aleksun and Levy, 1999).

Permeability changes mediated by altered porins are often part of a coordinated cellular response to the presence of numerous toxic agents, which includes simultaneous upregulation of efflux. This mechanism confers decreased susceptibility to a large number of other antimicrobial agents in addition to fluoroquinolones.

In antimicrobial efflux systems, membrane-localized proteins actively pump drug from the cell before it can diffuse to its primary target within the active site of DNA gyrase. Because they are driven by the proton motive force, energy uncouplers can be used to study their role in resistance. The *E. coli* genome carries as many as 30 potential efflux pumps, many of which mediate antimicrobial efflux. Some are effective for specific agents, whereas others protect against a variety of structurally diverse compounds. In addition, a single bacterium may contain multiple efflux pumps (e.g., AcrAB and cmlA) that are capable of extruding the same antimicrobial agent. Constitutive and inducible efflux is a known mechanism of fluoroquinolone resistance in both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and may be more important than secondary mutations in topoisomerase IV genes. For example, it has been shown that deletion of the gene encoding the inducible AcrAB efflux pump reduces ciprofloxacin MICs to near wild-type levels in cells carrying topoisomerase mutations (Oethinger et al., 2000).

Recently, a plasmid-mediated quinolone resistance gene (*qnr*) was described, first in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (Martínez-Martínez et al., 1998) and later in *E. coli* (Jacoby et al., 2003; Wang et al., 2003). The gene is located near sequences (*qacEÄ1*, *sull*) typically associated with class I integrons. In a concentration-dependent manner, *qnr* functions by protecting *E. coli* DNA gyrase, but not topoisomerase IV, from inhibition by ciprofloxacin (Tran and Jacoby, 2002). The *qnr* gene confers a small decrease in quinolone susceptibility such that *qnr*<sup>+</sup> strains are still considered clinically susceptible. It has been suggested that the impact on clinical resistance results from the ability of *qnr* to permit selection of topoisomerase mutants at concentrations that normally would be toxic to the bacterium (Martínez-Martínez et al., 1998).

Each of the fluoroquinolone resistance mechanisms (target modification, decreased permeability, efflux and target protection) can occur simultaneously within the same cell, thereby leading to very high resistance levels. To date, no mechanisms based on enzymatic inactivation/modification of quinolones have been discovered. Because quinolones are

synthetic antimicrobials with no known natural analogues, it is less likely that this type of mechanism will emerge.



## **6.- AIMS**

In veterinary medicine several fluoroquinolones have been licensed for use mainly in pets, pigs and cows. Therefore it is interesting, from the pharmacokinetic point of view, to investigate the disposition of these drugs in other species as horses, rabbits, goats or sheep. On the other hand, new fluoroquinolones have been developed in human medicine, and these antibiotics could potentially be applied to veterinary species. Because of this, the present work has the following objectives:

1. Establish the pharmacokinetic parameters of difloxacin and danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to horses.
2. Investigate the pharmacokinetic parameters in plasma, and penetration into milk, of difloxacin, ibafloxacin and orbifloxacin after several routes of administration to lactating goats.
3. Establish the pharmacokinetic parameters of difloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to sheep.
4. Development of a rapid, simple and sensitive method for the determination of ibafloxacin in rabbit plasma by HPLC with fluorescence detection.
5. Establish the pharmacokinetic parameters of ibafloxacin, danofloxacin, moxifloxacin and orbifloxacin in rabbits after different routes of administration. Determination of moxifloxacin disposition after subcutaneous administration of a long-acting poloxamer 407 gel formulation.
6. Determination of MICs (minimum inhibitory concentrations) of danofloxacin and orbifloxacin against *Staphylococcus aureus* strains obtained from commercial rabbitries, and establishment of pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of these drugs.

## **7.- TRABAJOS PUBLICADOS/PUBLISHED PAPERS**

**7.1 Pharmacokinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and intragastric administration to horses. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 67. N° 6. 2006.**

**7.2 Pharmacokinetics of danofloxacin in horses after intravenous, intramuscular and intragastric administration. *Equine Veterinary Journal*. Vol. 38. N° 4. 2006.**

**7.3 Pharmacokinetics of moxifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and a long-acting Poloxamer 407 gel formulation administration. *Journal of Veterinary Medicine Serie A*. Vol. 53. 2006.**

**7.4 Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol. 71. 2007.**

**7.5 Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 30. 2007.**



**7.6 Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 30. 2007.**

**7.7 Development of a Method for the determination of ibafloxacin in plasma by HPLC with fluorescence detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 45. 2007.**

**7.8 Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of difloxacin in sheep. Research in Veterinary Science. *Research in Veterinary Science*. Vol. 83. 2007.**

**7.9 Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to lactating goats. *Journal of Dairy Science*. Vol. 90(9). 2007.**

**7.10 Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of orbifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. In Press. doi: 10.1111/j.1365-2885.2007.00927.x**

## **8.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## 8.1 Animales

Para la realización de esta Tesis, se utilizaron seis animales de las siguientes especies y razas:

- Cabra: raza Murciano-Granadina, 45.8-65.4 kg.
- Caballo: raza Andaluz, 408-503 kg.
- Oveja: raza Segureña, 46.2-58.6 kg
- Conejo: raza Blanco Neozelandés, 2.9-4.6 kg.

Los animales, procedentes de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, permanecieron estabulados, con alimento y agua *ad libitum* durante toda la experiencia. Todos estaban en buen estado de salud y no recibieron ningún fármaco durante, al menos, 15 días previos antes del comienzo del estudio. Diariamente fueron observados para comprobar que se encontraban en perfecto estado de salud, antes y durante las experiencias.

## 8.2 Protocolo experimental

Se realizó en todos los casos un estudio cruzado, con un intervalo de 15 días entre cada administración. Los antibióticos usados se administraron por distintas vías: intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC) e intragástrica (IG), según el caso, a las dosis que se indican a continuación:

- Difloxacino (Dicural®, Fort Dodge Veterinaria). Dosis: 5 mg/kg.
- Danofloxacino (Advocin® 180, Pfizer Animal Health). Dosis: 1.25 mg/kg en caballo y 6 mg/kg en conejo.
- Orbifloxacino (Victas®, Dainippon SumitomoPharma). Dosis: 2.5 mg/kg en cabra y 5 mg/kg en conejo.
- Moxifloxacino: solución acuosa al 2% preparada y esterilizada en nuestro laboratorio, a partir de sustancia pura (Bayer AG). La preparación del gel de acción prolongada viene detallada en el correspondiente artículo. Dosis: 5 mg/kg y 30 mg/kg en formulación de acción sostenida.
- Ibfloxacino: solución acuosa al 5% preparada y esterilizada en nuestro laboratorio a partir de sustancia pura (Intervet Pharma). Dosis: 15 mg/kg.

La administración de las fluoroquinolonas se realizó, según el caso, por vía intravenosa (vena yugular derecha, excepto en el conejo que se utilizó la vena marginal de la oreja derecha), intramuscular (músculo semimembranoso, excepto en el caballo: zona ventral de la 3ª región del cuello), subcutánea (bajo la piel del lomo, región lateral a la línea media, a nivel toracolumbar, excepto en el conejo: entre ambas escápulas) e intragástrica (mediante sonda nasogástrica).

Los antibióticos se administraron en las distintas especies como se describe a continuación:

	<b>Caballo</b>	<b>Oveja</b>	<b>Cabra</b>	<b>Conejo</b>
<b>Difloxacino (5 mg/kg)</b>	IV, IM, IG	IV, IM, SC	IV, IM, SC	
<b>Danofloxacino</b>	IV, IM, IG (1.25 mg/kg)			IV, IM, SC (6 mg/kg)
<b>Orbifloxacino</b>			IV, IM, SC (2.5 mg/kg)	IV, IM, SC (5 mg/kg)
<b>Moxifloxacino (5 mg/kg)</b>				IV, SC
<b>Moxifloxacino SC-P407 (30 mg/kg)</b>				SC
<b>Ibafloxacino (15 mg/kg)</b>			IV	IV

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular izquierda (excepto en el conejo que se utilizó vena marginal de la oreja izquierda) a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas. Posteriormente fueron centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos, y el plasma obtenido fue congelado a  $-45^{\circ}\text{C}$  dentro de los treinta minutos siguientes a la extracción, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

En la especie caprina se estudia, además la eliminación en leche de cada fluoroquinolona. Las muestras de leche fueron tomadas a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 y 72 horas tras la administración de difloxacino, ibafloxacino y orbifloxacino, Las muestras fueron tomadas tras la evacuación completa de



ambas ubres, y posteriormente se congelaban dos alícuotas (2 mL) por duplicado a  $-45^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### **8.3 Técnicas analíticas**

Para la determinación de las concentraciones en plasma y leche de cada fluoroquinolona se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con estándar interno (se empleó el ciprofloxacino en todos los casos, a excepción del ácido acetil salicílico y la Sal sódica del éster STP del ácido 1- pirenbutanoico empleados en la determinación del ibafloxacino en conejo y cabra, respectivamente). El equipo de HPLC estaba equipado con una bomba cuaternaria modelo LC-10ASvp, un detector de fluorescencia RF-10AXL y una autoinyector SIL-10Advp (Shimadzu, Kioto, Japan). El equipo anterior estaba conectado a un ordenador con el programa Shimadzu Class-VP Chromatography Data System (Shimadzu, DC, USA).

Las sustancias puras de cada quinolona sometida a estudio y los correspondientes estándares internos fueron suministrados por:

- Difloxacino (Fort-Dodge, Madrid, España).
- Ciprofloxacino (Vita Pharma, Madrid, España).
- Orbifloxacino (Schering Plough Corporation, New Jersey, EEUU).
- Moxifloxacino (Bayer AG, Wuppertal, Alemania).
- Danofloxacino (Pfizer Animal Health, Madrid, España).
- Ibafloracino (Intervet, Salamanca, España).
- Ácido Salicílico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Sal sódica del éster STP del ácido 1- pirenbutanoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Para la determinación de cada quinolona (excepto para ibafloxacino en conejo), se empleó el método descrito por Siefert et al. (1999) modificado por nosotros. Tras la adición de 10  $\mu\text{L}$  del correspondiente estándar interno a 200  $\mu\text{L}$  de plasma o leche, se añaden 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. Las proteínas son precipitadas por agitación en un baño de ultrasonidos seguido de centrifugación durante 10-15 minutos a 1500-1600 g. Del sobrenadante se extraen 100  $\mu\text{L}$  y se diluyen 4 veces con tampón fosfato sódico 0,067 M (pH 7,5) y se transfiere a los viales del autoinyector.

El método para la determinación de ibafloxacino en plasma de conejo (artículo incluido en esta tesis), fue desarrollado por nuestro equipo. Tras la adición de 10  $\mu\text{L}$  del correspondiente estándar interno a 500  $\mu\text{L}$  de plasma, se añade 1 mL de acetonitrilo. Las proteínas son precipitadas por agitación en un baño de ultrasonidos seguido de centrifugación durante 10 minutos a 1600 g. El sobrenadante se extrae y se mezcla con 3 mL de cloruro de metileno. La mezcla se agita y se centrifuga durante 5 minutos a 1600 g. Tras esto, la fase acuosa se desecha, y la fase orgánica es sometida a un proceso de desecación. El residuo se redissuelve con 500 mL de tampón fosfato sódico 0,067 M (pH 7,5) y se transfiere a los viales del autoinyector.

Las columnas empleadas (fase reversa Discovery  $\text{C}_{18}$ ) para la separación y el volumen de inyección en el HPLC variaron dependiendo de la fluoroquinolona investigada (más detalles en los artículos). La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (14-40%) y por una solución de hidrogenosulfato tetrabutilamonio (5 g/L)(86-60%), los porcentajes de cada compuesto dependieron de la quinolona y la especie animal estudiada. Se empleó un método isocrático con un flujo constante de 1 mL/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión, para cada fluoroquinolona, fueron las siguientes:

Fluoroquinolona	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
Difloxacino	280	445
Danofloxacino	280	440
Moxifloxacino	296	504
Ibafloxacino	330	368
Orbifloxacino	338	425

#### 8.4 Método de validación

Las curvas de calibrado fueron preparadas, usando un “pool” de blancos de plasma o leche, a diferentes concentraciones de cada quinolona, entre 2.5-2000  $\mu\text{g/L}$  (más detalles en cada artículo). Las curvas patrón se obtuvieron por regresión lineal, sin ponderación, del área de los picos obtenidos frente a concentraciones conocidas de cada fármaco. Cada punto se estableció de un promedio de cinco o seis determinaciones (según quinolona y

especie animal). Los coeficientes de correlación ( $r$ ) fueron siempre  $> 0.97\%$  para todas las curvas de calibrado.

Los porcentajes de recuperación se determinaron comparando las áreas de los picos de los controles a las distintas concentraciones de fármaco, con las áreas de los picos de los estándares a las concentraciones correspondientes preparados con tampón fosfato. Cada punto se estableció a partir de un promedio de cinco o seis determinaciones (según quinolona y especie animal).

La precisión del ensayo se evaluó expresando la desviación estándar relativa (RDS) como un porcentaje del valor medio. La precisión intra-día se estimó mediante el análisis, en el mismo día, de seis muestras repetidas de tres concentraciones estándares usadas para las curvas de calibrado ( $RSD < 10\%$  para todas las quinolonas). La precisión inter-día se estimó mediante el análisis de tres concentraciones estándares durante tres días consecutivos ( $RSD < 10\%$  para todas las quinolonas).

El límite de detección en plasma y leche se estableció como el triple del ruido de fondo obtenido en el tiempo de elución de cada quinolona. El límite de cuantificación se estableció para el nivel de concentración más bajo utilizado en las curvas de calibrado y para el que el RSD es menor al 15%.

En la siguiente tabla podemos observar los porcentajes de recuperación en plasma y leche, así como los diferentes límites de cuantificación, de las distintas fluoroquinolonas usadas en las especies estudiadas:

Especie	Fármaco	Recuperación plasma (%)	Recuperación leche (%)	Limite de cuantificación (µg/L)
<b>Conejo</b>	Moxifloxacino	97.75	-	10
	Danofloxacino	93.8	-	2.5
	Orbifloxacino	90.85	-	10
	Ibafloxacino	95.91	-	10
<b>Caballo</b>	Danofloxacino	94.6	-	5
	Difloxacino	98.2	-	5
<b>Cabra</b>	Difloxacino	97.35	92.95	5 (plasma y leche)
	Orbifloxacino	94.78	92.02	25 (plasma y leche)
	Ibafloxacino	93.23	88.24	10 (plasma y leche)
<b>Oveja</b>	Difloxacino	95.68	-	5

## 8.5 Análisis farmacocinético

### • Análisis compartimental. Plasma

Una vez obtenidas las concentraciones de cada quinolona en plasma a los diferentes tiempos de extracción tras la administración, se han ajustado los datos a ecuaciones mono-, bi- y triexponenciales mediante el programa MULTI, propuesto por Yamaoka et al., (1981). Los ajustes se han realizado utilizando el algoritmo de DAMPING GAUSS-NEWTON y empleando como criterio de ponderación los inversos de las concentraciones. Una vez realizados los ajustes a los diferentes modelos farmacocinéticos, el criterio utilizado para determinar la ecuación que mejor se ajusta a los datos observados fue el Criterio de Información de Akaike ó AIC (Yamaoka et al., 1978).

- **Análisis no compartimental. Plasma**

Los parámetros no compartimentales se calcularon de acuerdo con la teoría de los momentos estadísticos (Gibaldi y Perrier, 1982), utilizando el programa informático WinNonlin Professional<sup>®</sup> (versión 5.0).

La biodisponibilidad se ha calculado relacionando las áreas totales bajo las curvas de concentración plasmática obtenidas por el método trapezoidal, tras las administraciones extravasculares e intravenosas.

- **Análisis de los datos en leche**

Los datos de concentración en leche obtenidos a los diferentes tiempos fueron analizados mediante un método no compartimental, usando el programa informático WinNonlin Professional<sup>®</sup> (versión 5.0). Se calcularon el AUC, porcentaje de recuperación y vida media de cada quinolona, para cada vía de administración.

## 8.6 Métodos estadísticos

Se calcularon los parámetros estadísticos de centralización, como media, desviación estándar y coeficiente de variación. La media armónica fue calculada para las vidas medias de absorción, distribución y eliminación. Para determinar si existían diferencias significativas entre los parámetros calculados para las distintas vías de administración, se empleó el test de WILCOXON y la t de student (Power, 1990). Para calcular las desviaciones típicas de las medias armónicas se utilizó el método de Jackknife. El software estadístico usado fue el SPSS (versión 11.0; SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU).

## 8.7 Aislados bacterianos y obtención de las MICs

Se estudiaron cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de diferentes países europeos (Bélgica, Grecia, España, Italia y Francia). Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron mediante el método de dilución en agar del NCCLS (Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2002). Tras incubar a +37°C durante una noche, el inóculo fue suspendido en solución salina al 0,9% NaCl hasta obtener una suspensión estándar de 0,5 según la escala de McFarland. Posteriormente, mediante un replicador de inóculos Denley, una dilución 1:10 de la anterior suspensión, se añadió a la mezcla de agar Mueller-Hinton II (Oxoid, Basingstoke, UK) y danofloxacino (o orbifloxacino) a distintas concentraciones, con la finalidad de observar el crecimiento o no

de colonias de microorganismos. Se estudiaron concentraciones de danofloxacino (y orbifloxacino) comprendidas entre 0,03 y 128  $\mu\text{g/mL}$ . Las placas fueron incubadas a  $+37^\circ\text{C}$ , y se observaron a las 24 horas. Se definió la concentración mínima inhibitoria como la mínima concentración que inhibía el crecimiento de los microorganismos.

## **9.- MATERIALS AND METHODS**

## 9.1 Animals

Six animals of four different species (breeds and bodyweights are also detailed) were used to carry out the experiments:

- Murciano-Granadina goats, 45.8-65.4 kg.
- Andaluz horses, 408-503 kg.
- Segureña sheep, 46.2-58.6 kg
- New Zealand white rabbits, 2.9-4.6 kg.

Animals were obtained from the Farm of the Faculty of Veterinary Medicine (University of Murcia). They were housed and fed an antibiotic-free diet. Water was provided *ad libitum*. Animals were determined to be clinically healthy and did not receive any drug treatment for at least 15 days preceding the study. For each treatment period of the cross-over, they were observed daily for general health, before and after the trials.

## 9.2 Experimental design

A cross-over design (2×2×2) was used in three phases with at least 15-day washout period. The antibiotics were given at single doses by different routes of administration: intravenous (IV), intramuscular (IM), subcutaneous (SC) and intragastric (IG) (depending on animal species and drugs):

- Difloxacin (Dicural®, Fort Dodge Veterinaria). Dose: 5 mg/kg.
- Danofloxacin (Advocin® 180, Pfizer Animal Health). Dose: 1.25 mg/kg in horses and 6 mg/kg in rabbits.
- Orbifloxacin (Victas®, Dainippon SumitomoPharma). Dose: 2.5 mg/kg in goats and 5 mg/kg in rabbits.
- Moxifloxacin: an aqueous solution (2%) of moxifloxacin was prepared from pure substance (Bayer Schering Pharma, Barcelona, Spain) and sterilized in our laboratory. Long-acting poloxamer 407 gel preparation is detailed in the corresponding paper. Dose: 5 mg/kg and 30 mg/kg in long-acting formulation.
- Ibafoxacin: an aqueous solution (5%) of ibafloxacin was prepared from pure substance (Intervet Pharma) and sterilized in our laboratory. Dose: 15 mg/kg.

Fluoroquinolones were administered by intravenous route (right jugular vein, except in rabbits where marginal vein from the right ear was used), intramuscular (semimembranous muscle, except in horses where right lower third region of the neck was



used), subcutaneous (under the skin of the back at a single location in the thoraco-lumbar region lateral of the mid-line, except in rabbits where between the shoulders blades was used) and intragastric (using a nasogastric tube).

Antibiotics were administered in the different species as indicated in the following table:

	<b>Horses</b>	<b>Sheep</b>	<b>Goats</b>	<b>Rabbits</b>
<b>Difloxacin (5 mg/kg)</b>	IV, IM, IG	IV, IM, SC	IV, IM, SC	
<b>Danofloxacin</b>	IV, IM, IG (1.25 mg/kg)			IV, IM, SC (6 mg/kg)
<b>Orbifloxacin</b>			IV, IM, SC (2.5 mg/kg)	IV, IM, SC (5 mg/kg)
<b>Moxifloxacin (5 mg/kg)</b>				IV, SC
<b>Moxifloxacin SC-P407 (30 mg/kg)</b>				SC
<b>Ibafloxacin (15 mg/kg)</b>			IV	IV

Blood samples were collected from the left jugular vein (except marginal vein from the left ear in rabbits) at the following times: 0 (blank), 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours. Samples were centrifuged at 1500 g for 15 min within 30 min after collection. Plasma was immediately removed and stored at  $-45^{\circ}\text{C}$  until assayed.

Milk disposition of each fluoroquinolone was studied in goats. Milk samples were collected before and at 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 and 72 h post administration of ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin after complete evacuation of the udder. These samples were immediately stored at  $-45^{\circ}\text{C}$  until assayed.

### 9.3 Analytical methods

Plasma and milk concentrations of each fluoroquinolone were measured using a modified HPLC method with internal standards (ciprofloxacin was used in every studies, except salicylic acid and 1-pyrenebutanoic acid, STP-ester, sodium salt, that were used for

ibafloxacin determination). The HPLC system was equipped with a model LC-10ASvp pump, a RF-10AXL Fluorescence Detector and a model SIL-10ADvp autoinjector (Shimadzu, Kyoto, Japan). The above-mentioned system was connected to a computer with a Shimadzu Class-VP<sup>TM</sup> Chromatography Data System programme (Shimadzu, DC, USA).

Pure substances of each quinolone and internal standards used in the studies were supplied by:

- Difloxacin (Fort-Dodge, Madrid, España).
- Ciprofloxacin (Vita Pharma, Madrid, España).
- Orbifloxacin (Schering Plough Corporation, New Jersey, EEUU).
- Moxifloxacin (Bayer AG, Wuppertal, Alemania).
- Danofloxacin (Pfizer Animal Health, Madrid, España).
- Ibafoxacin (Intervet, Salamanca, España).
- Salicylic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- 1-pyrenebutanoic acid, STP-ester, sodium salt (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Concentrations of each fluoroquinolone (except the method for the determination of ibafloxacin in rabbit plasma) were measured using a modified HPLC method previously reported (Siefert et al., 1999). After addition of 10  $\mu$ L of the internal standard to 200  $\mu$ L of plasma or milk, 200  $\mu$ L acetonitrile was added. Plasma and milk proteins were precipitated by shaking in an ultrasonic bath followed by centrifugation for 10-15 min at 1500-1600 g. The supernatant was diluted 4-fold with 0.067 M di-Sodium hydrogen phosphate buffer pH=7.5 and transferred to HPLC autosampler vials.

The method for the determination of ibafloxacin in rabbit plasma (paper included in this PhD) was developed by us. After addition of 10  $\mu$ L of internal standard solution, 1 mL acetonitrile was added to 500  $\mu$ L of plasma. Plasma proteins were precipitated by shaking in an ultrasonic bath during 5 min followed by centrifugation for 10 min at 1600 g. Supernatant was extracted and 3 ml of methylene chloride were added. The mixture was mixed and centrifuged for 5 min at 1600 g. Aquous phase was removed and organic phase was conducted to desecation. Residue was redissolved with 500  $\mu$ L of 0.067 M disodium hydrogen phosphate buffer pH=7.5 and transferred to HPLC autosampler vials.

The HPLC separation was performed using a reverse-phase Discovery C<sub>18</sub> and the injection volume varied depending on each investigated fluoroquinolone (more details in

the papers). The mobile phase consisted of acetonitrile (14-40%) and tetrabutylammonium hydrogensulphate solution (5 g/L) (86-60%), these percentages varied depending on each quinolone and animal species. An isocratic method were used with a flow rate of 1.0 mL/min. The excitation and emission wavelengths of each quinolone are shown in the following table:

Fluoroquinolone	Excitation wavelength	Emission wavelength
Difloxacin	280	445
Danofloxacin	280	440
Moxifloxacin	296	504
Ibafloxacin	330	368
Orbifloxacin	338	425

#### 9.4 Method validation

Calibration curves were prepared from a pool of blank plasma or milk samples spiked with different concentrations of each quinolone ranging between 2.5-2000  $\mu\text{g/L}$  (more details in the papers). Standard curves were obtained by unweighed linear regression of peak areas versus known concentrations of each quinolone. Each point was established from an average of five or six determinations (depending on the drug and animal species). Correlations coefficients ( $r$ ) were  $> 0.97$  for all calibration curves.

The percentage recovery was determined by comparison of the peak areas of plasma and milk blank samples spiked with different amounts of drug and treated as any sample, with the peak areas of the same standards prepared in phosphate buffer. Each point was established from an average of five or six determinations (depending on the drug and animal species).

The assay precision (R.S.D.) was assessed by expressing the standard deviation of repeated measurements as a percentage of the mean value. Intra-day precision was estimated from six replicates of three standard samples (plasma or milk) used for calibration curves (R.S.D. $<10$  % for all quinolones). Inter-day precision was estimated from the analysis of standard samples (plasma or milk) on three separate days (R.S.D. $<10$  % for all quinolones).

The limit of detection (LOD) was determined as three times the signal/noise ratio at the time of elution of the analyte. The limit of quantification (LOQ) was chosen as the lowest concentration on the calibration curve that can be determined with acceptable precision (RSD<15%).

Percentage recoveries and limits of quantification from plasma and milk are shown in the following table:

<b>Specie</b>	<b>Drug</b>	<b>Plasma Percentage Recovery (%)</b>	<b>Milk Percentage Recovery (%)</b>	<b>Limit of quantification (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
Rabbits	Moxifloxacin	97.75	-	10
	Danofloxacin	93.8	-	2.5
	Orbifloxacin	90.85	-	10
	Ibafloxacin	95.91	-	10
Horses	Danofloxacin	94.6	-	5
	Difloxacin	98.2	-	5
Goats	Difloxacin	97.35	92.95	5 (plasma and milk)
	Orbifloxacin	94.78	92.02	25 (plasma and milk)
	Ibafloxacin	93.23	88.24	10 (plasma and milk)
Sheep	Difloxacin	95.68	-	5

## 9.5 Pharmacokinetic analysis

### • Compartmental analysis. Plasma

The plasma concentration-time data obtained after each treatment in each individual animal were initially fitted to one-, two-, and three-exponential equations by the retroprojection method (Gibaldi and Perrier, 1982). The final curve fitting was carried out using non-linear regression with the MULTI computer program and the Gauss-Newton damping algorithm (Yamaoka et al., 1981). Akaike's Information Criterion (Yamaoka et al., 1978) was used to determine the best equation that define plasma concentration-time data for each animal and route of administration; and the most appropriate weighing of these data.

### • Noncompartmental analysis. Plasma

A non-compartmental model (WinNonlin Professional version 5.1, Pharsight Corporation, California, USA) was used to determine non-compartmental parameters.

Bioavailability (F) was calculated by the method of corresponding areas:

$$F (\%) = AUC_{SC,IM,IG} \times 100 / AUC_{IV}$$

### • Noncompartmental analysis. Milk

The milk concentration-time data were analysed by non-compartmental methods using WinNonlin Professional programme (version 5.1). Recovery (%), half-life and  $AUC_{milk}$  of each quinolone were calculated.

## 9.6 Statistical Methods

Descriptive statistical parameters as mean, standard deviation and coefficient of variation were calculated. Harmonic means were calculated for the half-lives of distribution, elimination and absorption, and standard deviation of harmonic means were calculated with the Jackknife method. The Wilcoxon Rank Sum test and Student's t test were used to test parameters for significant differences among the different routes of administration in each species (Power, 1990). The statistical software used was SPSS (Version 11.0).

### 9.7 Bacterial isolates and MICs

Rabbit *S. aureus* strains were tested for minimum inhibitory concentrations (MICs). The strains were isolated from commercial rabbitries in Italy, Spain, Greece, France and Belgium. The MICs were determined using the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) agar dilution method (NCCLS, 2002). After overnight incubation at 37°C, the inocula were suspended in 0.9% NaCl solution to a 0.5 McFarland standard. By means of a Denley inoculum applicator, a 1/10 dilution of these suspensions was inoculated on Mueller-Hinton II agar (Oxoid, Basingstoke, England) containing orbifloxacin (or danofloxacin) concentrations ranging from 0.03 µg/mL to 128 µg/mL. The plates were incubated at 37°C and observed after 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration producing no visible growth.

## **10.- RESULTADOS**

### 10.1 TÉCNICA DE DETERMINACIÓN DE IBAFLOXACINO

Las curvas de calibrado empleadas en este ensayo muestran una respuesta lineal en los rangos de concentración de 10-100 y 100-2000 µg/L. Las curvas de calibrado obtenidas son las siguientes:

- para el rango 10-100 µg/L:  $y = 0.000187(\pm 0.00)x - 7.5476(\pm 2.25)$ ,  $r^2 > 0.9970$ .

- para el rango de 100-2000 µg/L:  $y = 0.0002246(\pm 0.00)x - 5.7332(\pm 5.38)$ ,  $r^2 > 0.990$ .

El límite de cuantificación (LOQ) es 10 µg/L y el límite de detección 5 µg/L.

Los valores medios de recuperación de ibafloxacino a distintas concentraciones aparecen en la siguiente tabla:

**Tabla 1: Porcentajes de recuperación de ibafloxacino.**

Concentración nominal (µg/L)	Recuperación (%) Media ± S.D (n=5)
50	88.52 ± 5.61
250	105.52 ± 4.83
1000	94.21 ± 5.60

La repetitibilidad intra-día fue determinada con tres concentraciones diferentes, obteniendo, en todos los casos, un RSD menor al 8%. La precisión y exactitud intra-día a dichas concentraciones aparece en la siguiente tabla:

**Tabla 2: Valores de exactitud y precisión intra-día.**

Concentración nominal (µg/L)	Concentración obtenida(µg/L)± S.D	Exactitud (%) ± S.D	Precisión R.S.D (%)
50	56.44 ± 4.04	112.89 ± 8.08	7.15
500	459.21 ± 21.99	91.84 ± 4.40	4.78
1000	976.65 ± 57.65	97.66 ± 5.77	5.90

La repetitibilidad entre-día también fue determinada con las mismas concentraciones, obteniendo un RSD del 4% aproximadamente. La precisión y exactitud entre-día a dichas concentraciones se muestra en la siguiente tabla:



**Tabla 3: Valores de exactitud y precisión entre-días.**

<b>Concentración nominal (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Concentración obtenida(<math>\mu\text{g/L}</math>)<math>\pm</math> S.D</b>	<b>Exactitud (%) <math>\pm</math> S.D</b>	<b>Precision R.S.D (%)</b>
50	54.03 $\pm$ 2.18	108.05 $\pm$ 4.36	4.03
500	456.65 $\pm$ 6.03	91.71 $\pm$ 1.21	1.32
1000	927.37 $\pm$ 34.10	92.73 $\pm$ 3.41	3.68

La interferencia de ibafloxacino con otras fluoroquinolonas fue evaluada usando este método. Danofloxacino, difloxacino, moxifloxacino, enrofloxacino y ciprofloxacino no fueron detectados usando las condiciones descritas en la metodología, probablemente porque a las longitudes de onda de excitación (330 nm) y emisión (368 nm) usadas, estas quinolonas no son detectables. Por tanto, ninguna de ellas puede usarse como estándar interno.

## **10.2 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO**

### **10.2.1 MODELO FARMACOCINÉTICO**

Tras el análisis compartimental se comprobó que, tras la administración IV, en todos los casos, la evolución de las concentraciones plasmáticas se ajustan a un modelo bicompartimental. Este modelo está de acuerdo con las características de las fluoroquinolonas, que penetran a nivel intracelular (Brown, 1996). Concuerta además con el modelo obtenido, tras administración IV, para el moxifloxacino en la cabra (Fernandez-Varón et al., 2006b) y el conejo (Fernández-Varón et al., 2005) y, quizá en el hombre, el mono, el perro y cobaya, pues así parece deducirse de las curvas de concentración plasmática que presentan Siefert et al. (1999). También el danofloxacino (Aliabadi y Lees, 2001), el marbofloxacino (Waxman et al., 2001), el pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah, 2002) y el enrofloxacino (Abo El-Sooud, 2003) se ajustan en la cabra a un modelo bicompartimental.

Las administraciones extravasculares se ajustan, según el caso, a modelos mono y bicompartimentales. A menudo, cuando un fármaco “bicompartimental” se administra por vía extravascular se ajusta a un modelo monocompartimental. Así ocurre con el moxifloxacino en el conejo (Fernández-Varón et al., 2005). La diferencia en el modelo farmacocinético quizá se deba a que en la fase de disposición rápida, que aparece tras la

administración IV, la desaparición del fármaco del plasma se rige por una cinética de primer orden, cuya velocidad es directamente proporcional a la concentración plasmática. Por lo que a menores concentraciones, la velocidad disminuye y puede ocurrir que esa primera fase no se llegue a manifestar plenamente. Además, puede verse enmascarada por otros procesos como la absorción.

En la tabla 4 se esquematizan estos resultados. Con el moxifloxacino no se realizó un estudio compartimental pues ya fue descrito previamente por nuestro grupo (Fernández-Varón et al., 2005) y aquí se inicia una nueva línea de investigación: el uso de formas de liberación retardadas. Tampoco se realizó con las vías extravasculares en la oveja, ni con la vía IV en conejo para ibafloxacino, ya que con las concentraciones obtenidas no se podía discernir a que modelo compartimental se ajustaban mejor. Por tanto se optó por un análisis no compartimental.

**Tabla 4: Modelos farmacocinéticos compartimentales de ajuste de las diversas fluoroquinolonas en las especies estudiadas.**

	Caballo			Oveja			Cabra			Conejo		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacino (5 mg/kg)</b>	BI	MO	MO	BI	-	-	BI	BI	BI			
<b>Danofloxacino</b>	BI	MO	BI							BI	MO	MO
<b>Orbifloxacino</b>							BI	BI	BI	BI	BI	BI
<b>Ibafloxacino (15 mg/kg)</b>							BI			-		

La evolución de los valores medios de concentración plasmática ( $\pm$  SD) de ibafloxacino, moxifloxacino, difloxacino, danofloxacino y orbifloxacino, a los distintos tiempos de extracción, en las diferentes especies estudiadas y por las distintas rutas de administración se muestran en las figuras 1 a 15, mediante representación semilogarítmica. En la siguiente tabla se detalla el número de la figura que corresponde a cada caso concreto.

**Tabla 5: Relación de las figuras representativas de la evolución de las concentraciones plasmáticas en el tiempo de cada fluoroquinolona, según la especie y vía de administración.**

	Caballo			Oveja			Cabra			Conejo		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacino</b>	7	8	9	4	5	6	1	2	3			
<b>Danofloxacino</b>	10	11	12							13	14	15
<b>Orbifloxacino</b>							1	2	3	13	14	15
<b>Moxifloxacino</b>										13		15
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>												15
<b>Ibafloxacino</b>							1			13		

## 10.2.2 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

### 10.2.2.1. SEMIVIDA ó $t_{1/2\lambda_z}$

La semivida de la fase de disposición lenta ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) es considerada como la semivida real de un fármaco bicompartimental al ser  $\lambda_z$  la constante híbrida que mayoritariamente controla el proceso (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982). Como parámetro representativo se escoge el obtenido por vía intravenosa ya que, si bien tras una administración extravascular cabe esperar obtener el mismo valor (o, al menos parecido), es común obtener valores más elevados al verse afectado por diversos factores como la absorción. En la tabla 6 se indican los valores de  $t_{1/2\lambda_z}$ , en horas, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 6: Semividas de las fluoroquinolonas, administradas por las diversas vías, en las especies estudiadas.**

	Caballo			Oveja			Cabra			Conejo		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacino</b>	2.66	5.72	10.75	11.43	13.89	12.02	4.92	10.44	7.33			
<b>Danofloxacino</b>	6.31	5.36	4.74							4.88	6.70	8.20
<b>Orbifloxacino</b>							4.12	3.34	4.99	2.50	2.54	5.14
<b>Moxifloxacino</b>										2.15		5.41
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>												11.09
<b>Ibafloxacino</b>							3.76			2.85		

Si nos fijamos en el caballo, observamos como el danofloxacino tras su administración IV presenta una semivida casi 2.4 veces mayor que el difloxacino. Este hecho se atenúa sensiblemente cuando se administran por vía IM, en cuyo caso las semividas prácticamente se igualan. En cambio, la administración IG invierte lo ocurrido tras la administración IV, de forma que la semivida del difloxacino es, en este

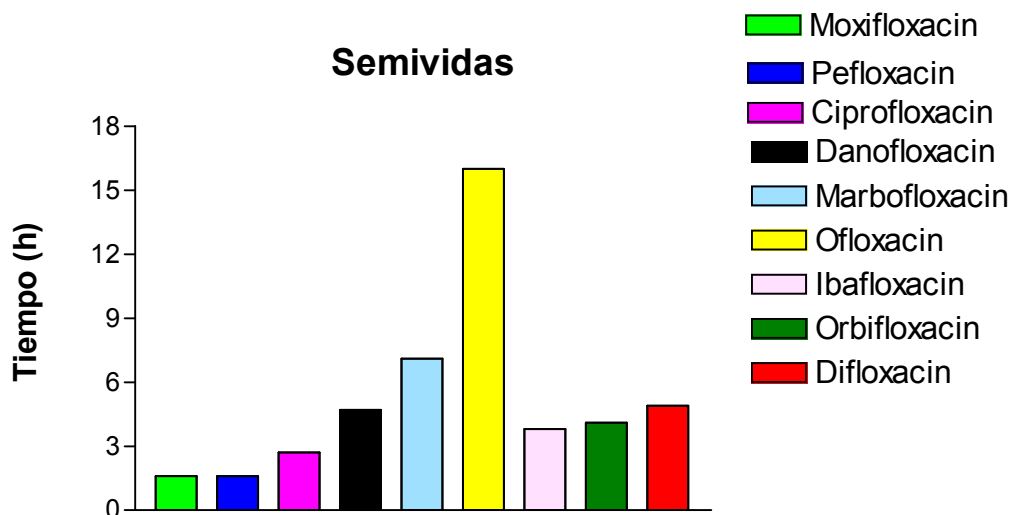
caso, casi 2.3 veces superior a la del danofloxacin. Todo esto sugiere que, cuando se escoge una administración IM no existen diferencias en este parámetro, entre el difloxacin y el danofloxacin. Sin embargo, si se realiza una administración intragástrica las ventajas del difloxacin parecen evidentes.

En la oveja sólo se ha estudiado el difloxacin y, a la vista de los resultados, se comprueba que no existen diferencias significativas ( $p > 0.5$ ) entre los valores de semivida obtenidos tras las administraciones IM y SC. Por ello, atendiendo a este parámetro, no parece existir ventaja alguna de una administración frente a otra.

En la cabra, las semividas obtenidas tras la administración intravenosa de difloxacin y orbifloxacin (4.92 y 4.12 h, respectivamente), son semejantes entre sí y ligeramente superiores a la obtenida para ibafloxacin (3.76 h).

Respecto a otras fluoroquinolonas en la cabra, se han descrito valores de semividas que oscilan entre las 1.6 y 15.5 horas tras la administración intravenosa, como podemos ver en la siguiente figura:

**Figura 1: Semividas de diversas fluoroquinolonas en la cabra tras la administración intravenosa** (Fernández- varón et al., 2006b, Abd El-Aty y Goudah, 2002, El Banna y Abo El-Sooud, 1998, Aliabadi y Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Baruah et al., 2004, Marín et al., 2007a, Marín et al., 2007b, Marín et al., 2007c).



Si atendemos a las semividas obtenidas tras la administración extravascular, se comprueba que el orbifloxacin muestra diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ),

pero no entre la administración IV y las extravasculares ( $p > 0.05$ ), en la cabra. En el caso del difloxacino, en la misma especie, existen diferencias significativas entre las administraciones extravasculares y la administración IV ( $p < 0.05$ ), siendo casi 1.5 veces mayor la semivida para la vía IM que para la SC y más del doble que para la IV.

En el conejo, observamos como el danofloxacino, tras su administración IV, presenta una semivida casi 2 veces mayor que el moxifloxacino, orbifloxacino e ibafloxacino. Este hecho también se repite para la vía IM, siendo la semivida del danofloxacino el doble de la de orbifloxacino. Tras la administración SC, la formulación de liberación sostenida alcanza la mayor semivida, como es previsible, siendo ésta el doble que la de moxifloxacino y orbifloxacino, y existiendo diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). A la vista de estos resultados, la administración de moxifloxacino en formulación de liberación sostenida es ventajosa frente a las otras formulaciones.

Danofloxacino, presenta también una semivida prolongada (8.20 h) tras su administración SC, este valor es superior al obtenido por otros autores con otras fluoroquinolonas en conejo (Marangos et al., 1997; Fernández-Varón et al., 2007).

#### **10.2.2.2. TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA ó MRT**

El análisis farmacocinético no compartimental permite calcular el denominado tiempo medio de residencia (MRT). Este parámetro es independiente del modelo farmacocinético elegido y tiene un significado análogo al tiempo de vida media que se halla en los modelos compartimentales. En la tabla siguiente se indican los valores de MRT, en horas, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 7: Valores de MRT (h) tras las diversas vías de administración, en las distintas especies, de las fluoroquinolonas estudiadas.**

	Caballo			Oveja			Cabra			Conejo		
	I.V.	I.M.	I.G.	I.V.	I.M.	S.C.	I.V.	I.M.	S.C.	I.V.	I.M.	S.C.
<b>Difloxacino</b>	3.67	5.03	4.45	8.07	15.83	12.62	3.59	8.92	7.26			
<b>Danofloxacino</b>	6.17	8.12	6.46							4.14	5.01	4.73
<b>Orbifloxacino</b>							2.75	2.82	3.58	1.88	2.36	2.80
<b>Moxifloxacino</b>										2.61		5.21
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>												7.99
<b>Ibafloxacino</b>							1.50			1.03		

En el conejo, tras la administración intravenosa, podemos observar que el valor de MRT para danofloxacino es superior a los obtenidos para orbifloxacino, moxifloxacino e ibafloxacino. Como ocurría con las semividas, el MRT intravenoso del danofloxacino es 2 veces mayor que el de moxifloxacino y orbifloxacino. Este hecho también se repite para la vía IM, siendo el MRT del danofloxacino el doble del de orbifloxacino. Tras la vía SC, moxifloxacino y danofloxacino presentan valores similares, alcanzando el mayor MRT moxifloxacino en formulación de liberación sostenida y el menor orbifloxacino. Existieron diferencias significativas entre las vías de administración extravasculares y la vía IV para orbifloxacino ( $p < 0.05$ ), y entre la vía IM y la IV para danofloxacino ( $p < 0.05$ ).

Existen estudios previos que abordan la farmacocinética de otras quinolonas en conejo, pero solo algunos han determinado el MRT correspondiente. Así, Fernández-Varón et al., (2005, 2007), obtuvieron un MRT para moxifloxacino (2.44 h) similar al obtenido en nuestro estudio tras la administración IV, y para difloxacino un MRT de 4.82 h y 5.18 h, tras la administración IV y SC. Estos últimos valores son similares a los obtenidos para danofloxacino en nuestro estudio.

Podemos observar como los MRTs se comportan de forma similar a las semividas, salvo excepciones concretas.

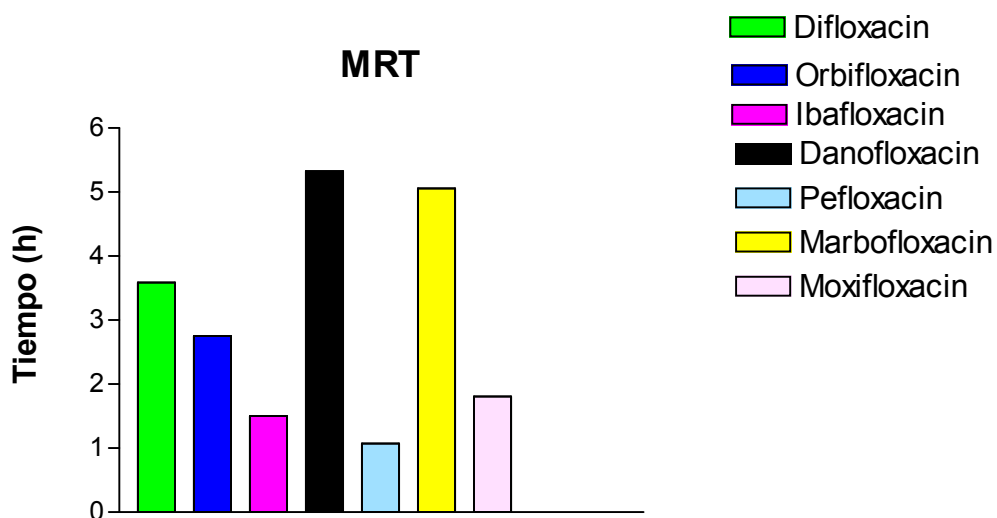
En la oveja los valores obtenidos presentan diferencias significativas entre la administración IV y las vías extravasculares ( $p < 0.05$ ). Dichos valores son superiores a los publicados para otras fluoroquinolonas como enrofloxacino ( $MRT_{IV} = 4.81$  h y  $MRT_{IM} = 4.52$  h; Haritova et al., 2003), danofloxacino ( $MRT_{IV} = 4.45$  h y  $MRT_{IM} =$

5.45 h; McKellar et al., 1998) y moxifloxacino ( $MRT_{IV} = 2.36$  h y  $MRT_{IM} = 4.68$  h; Goudah, 2007).

Podemos observar en el caballo como los valores de MRT obtenidos para difloxacino son menores que los obtenidos para danofloxacino. Además, no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los obtenidos para danofloxacino por las diferentes vías de administración, mientras si aparecen entre la administración IV y las vías extravasculares ( $p < 0.05$ ) para difloxacino. Estos valores son similares a los obtenidos para otras fluoroquinolonas como marbofloxacino ( $MRT_{IV} = 5.96$  h,  $MRT_{IM} = 6.91$  h y  $MRT_{OR} = 8.97$  h; Carretero et al., 2002; Bousquet-Melou et al., 2002) y orbifloxacino ( $MRT_{IV} = 5.81$  h y  $MRT_{OR} = 5.2$  h; Davis et al., 2006).

En la cabra, los MRTs obtenidos tras la administración IV de difloxacino y orbifloxacino (3.59 y 2.75 h, respectivamente), son semejantes entre sí y ligeramente superiores al obtenido para ibafloxacino (1.50 h). Si atendemos a los MRTs obtenidos tras administraciones extravasculares, se comprueba que el orbifloxacino y el difloxacino muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre éstas y la administración IV. Respecto a otras fluoroquinolonas en la cabra, se han descrito valores de MRTs que oscilan entre las 1.07 y 5.33 horas tras la administración intravenosa, como podemos ver en la siguiente figura:

**Figura 2: Valores de MRT de diversas fluoroquinolonas en la cabra tras la administración intravenosa** (Fernández- varón et al., 2006b, Abd El-Aty y Goudah, 2002, Aliabadi y Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Marín et al., 2007a, Marín et al., 2007b, Marín et al., 2007c).



### 10.2.2.3. VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN APARENTE EN ESTADO ESTACIONARIO ó $V_{ss}$

En la tabla siguiente se indican los valores de  $V_{ss}$ , en L/kg, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

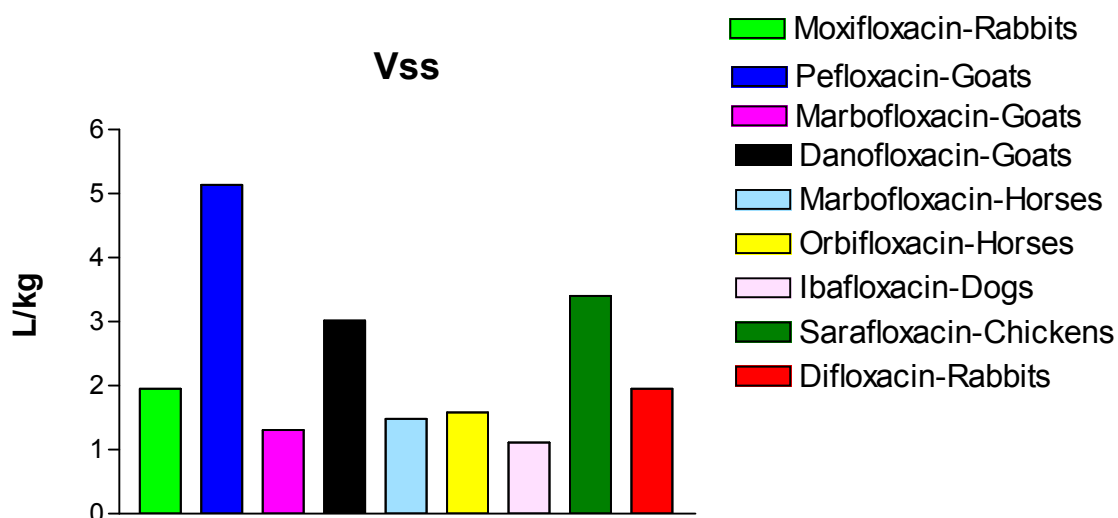
**Tabla 8: Valores de  $V_{ss}$  (L/kg) de las diversas fluoroquinolonas en las especies estudiadas.**

	<b>Caballo</b>	<b>Oveja</b>	<b>Cabra</b>	<b>Conejo</b>
<b>Difloxacino</b>	1.02	1.68	1.16	
<b>Danofloxacino</b>	2.00			3.16
<b>Orbifloxacino</b>			1.13	1.71
<b>Moxifloxacino</b>				2.08
<b>Ibafloxacino</b>			1.65	5.09

Los volúmenes de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) adquieren valores superiores a 1 L/kg en todos los casos, estos valores son altos, e indican que los fármacos estudiados tienen una amplia distribución en las especies correspondientes. En la cabra los valores son similares para las tres quinolonas, sin embargo en el conejo, los volúmenes de distribución de ibafloxacino y danofloxacino, son superiores a los de orbifloxacino y moxifloxacino. En el caballo el valor obtenido para danofloxacino es el doble que el de difloxacino.

En otras especies, otras quinolonas también han mostrado valores de  $V_{ss}$  que demuestran que las fluoroquinolonas se distribuyen ampliamente en tejidos, como vemos en la figura 03 (Fernández- varón et al., 2005, Abd El-Aty y Goudah, 2002, Aliabadi y Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007):



Figura 3: Valores de  $V_{ss}$  (L/kg) de diversas fluoroquinolonas en varias especies.

#### 10.2.2.4. ACLARAMIENTO PLASMÁTICO ó CI

En la tabla siguiente se indican los valores de CI, en L/h·kg, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

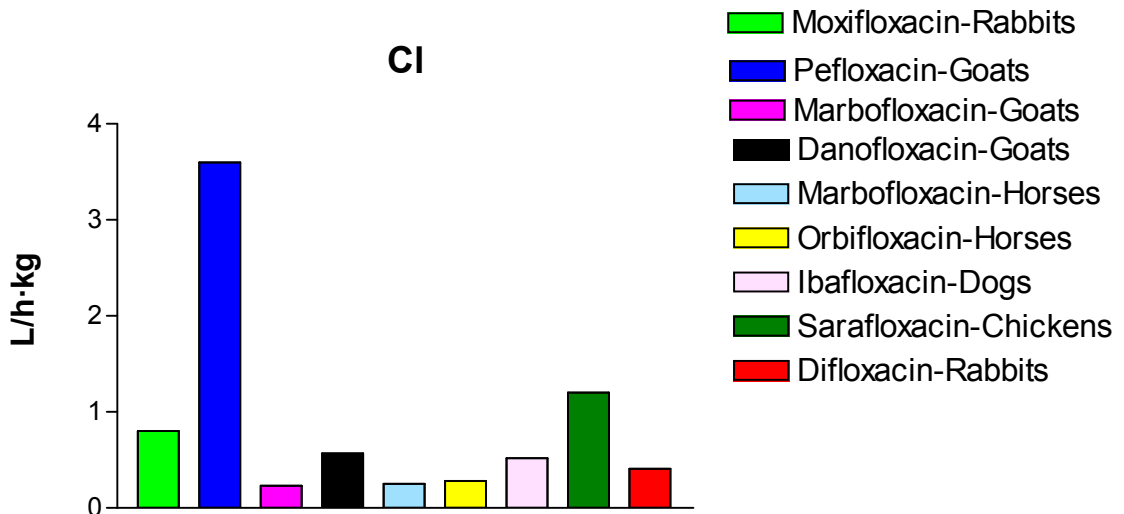
**Tabla 9: Valores de CI (L/h·kg) de las diversas fluoroquinolonas en las especies estudiadas.**

	Caballo	Oveja	Cabra	Conejo
<b>Difloxacino</b>	0.28	0.21	0.32	
<b>Danofloxacino</b>	0.34			0.76
<b>Orbifloxacino</b>			0.40	0.91
<b>Moxifloxacino</b>				0.78
<b>Ibafoxacino</b>			1.05	5.83

Podemos observar valores similares de aclaramiento plasmático para difloxacino en la cabra, oveja y caballo, que no difieren demasiado de los obtenidos en conejo (CI = 0.41 L/h·kg, Fernández-Varón et al., 2007) y en terneros (CI = 0.13 L/h·kg, Ismail, 2007). Sin embargo, para danofloxacino, ibafloxacino y orbifloxacino, el valor del

aclaramiento obtenido en el conejo es superior a los obtenidos en otras especies de mayor peso corporal, por tanto podemos observar, que el aclaramiento plasmático de las fluoroquinolonas disminuye en aquellas especies con mayor peso corporal, como también ha indicado Siefert et al., (1999). Otros autores han publicado valores de aclaramiento en otras especies y con quinolonas diferentes que se recogen en la figura 4:

**Figura 4: Valores de CI (L/h·kg) de diversas fluoroquinolonas en varias especies** (Fernández- varón et al., 2005, Abd El-Aty y Goudah, 2002, Aliabadi y Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007).



#### 10.2.2.5. ÁREA BAJO LA CURVA ó AUC

El área bajo la curva de nivel plasmático, es un parámetro que nos permite calcular el aclaramiento plasmático y la biodisponibilidad del fármaco tras su administración extravascular. Este parámetro se calcula integrando, entre tiempo cero e infinito, la curva de concentración plasmática-tiempo y puede ser calculado por análisis compartimental (a partir de la ecuación general del proceso) o por análisis no compartimental (métodos trapezoidal o logarítmico trapezoidal, a partir de la curva experimental), como en este caso. En la tabla siguiente se indican los valores de AUC,

en mg·h/L, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 10: Valores de AUC (mg·h/L) de las diversas fluoroquinolonas, administradas por diversas vías, en las especies estudiadas.**

	Caballo			Oveja			Cabra			Conejo		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacino</b>	18.37	17.61	12.52	24.23	23.62	19.40	15.84	16.70	14.17			
<b>Danofloxacino</b>	3.80	3.32	0.86							8.00	8.19	7.68
<b>Orbifloxacino</b>							6.15	5.98	6.47	5.74	6.75	7.00
<b>Moxifloxacino</b>										6.66		7.67
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>												14.52
<b>Ibafloxacino</b>							15.19			2.61		

Podemos observar en el caballo, que el AUC obtenido para difloxacino (dosis: 5 mg/kg) es 5 veces mayor que para danofloxacino (dosis: 1.25 mg/kg) tras la administración IV e IM, y 14 veces superior tras la administración IG. Existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la administración IG e IV en ambos fármacos, y entre las administraciones extravasculares en el caso de danofloxacino. En el rango de estos valores, están los AUC de varias quinolonas publicados previamente en caballo por otros autores como orbifloxacino (dosis: 2.5 mg/kg;  $AUC_{IV} = 9.04$  mg·h/L y  $AUC_{IM} = 6.16$  mg·h/L; Davis et al., 2006), marbofloxacino (dosis: 2 mg/kg;  $AUC_{IV} = 8.26$  mg·h/L,  $AUC_{OR} = 5.11$  mg·h/L y  $AUC_{SC} = 7.94$  mg·h/L; Bousquet-Melou et al., 2002) y norfloxacino (dosis: 4 mg/kg;  $AUC_{IV} = 8.26$  mg·h/L y  $AUC_{OR} = 4.69$  mg·h/L; Park y Yun, 2003).

En el caso de la oveja observamos un AUC obtenido para difloxacino (dosis: 5 mg/kg) por las tres rutas de administración muy elevado, siendo menor el obtenido con la misma quinolona y dosis en la cabra. En ambos casos existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la administraciones extravasculares. El AUC de ibafloxacino (dosis: 15 mg/kg) tras la vía IV en la cabra es muy similar al obtenido para difloxacino, y muy superior al obtenido en conejo con ibafloxacino a la misma dosis.

En el caso del orbifloxacino, los valores de AUC obtenidos en la cabra y en el conejo son similares, a pesar de emplear doble de dosis en el conejo. No existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores de AUC en la cabra, y si entre la administración IV y las administraciones extravasculares en el conejo.

Para danofloxacin, los valores obtenidos en conejo (dosis: 6 mg/kg), son parecidos por las tres vías de administración, sin existir diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellos, y similares a los obtenidos en la misma especie para moxifloxacin (dosis: 5 mg/kg), que tampoco se diferencian entre si ( $p > 0.05$ ). Si resultan diferentes los valores de AUC obtenidos con la formulación de liberación sostenida de moxifloxacin que prácticamente doblan a los anteriores, pero también la dosis administrada fue muy superior.

#### 10.2.2.6. BIODISPONIBILIDAD ó F

En la tabla siguiente se indican los valores de F, en %, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 11: Valores de F (%) de las distintas fluoroquinolonas, administradas por diversas vías, en las especies estudiadas.**

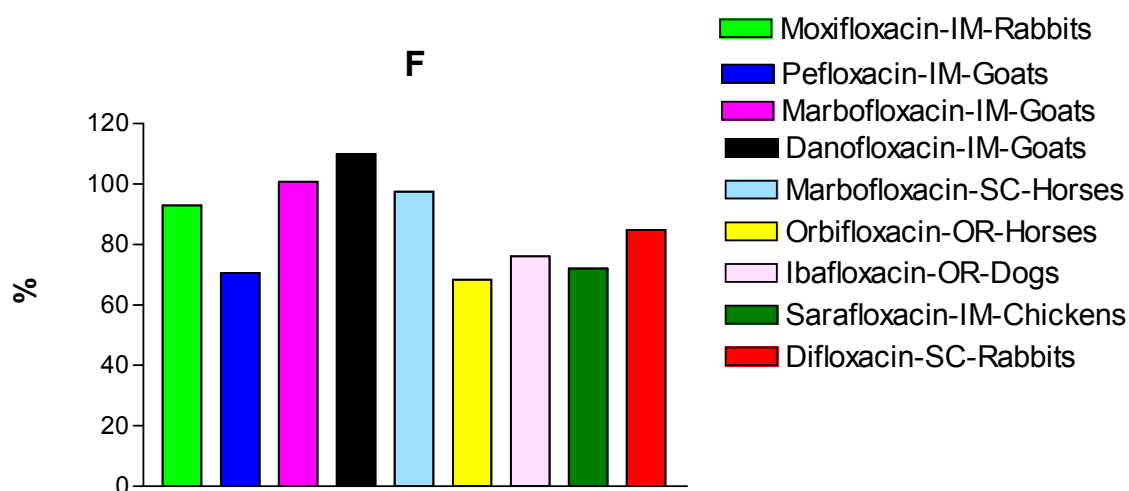
	Caballo		Oveja		Cabra		Conejo	
	IM	IG	IM	SC	IM	SC	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	95.81	68.62	99.92	82.35	106.79	90.16		
<b>Danofloxacin</b>	88.48	22.36					102.34	96.44
<b>Orbifloxacin</b>					105.01	108.96	109.87	110.67
<b>Moxifloxacin</b>								117.00
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>								44.00

La biodisponibilidad obtenida en todas las vías de administración, con las diferentes especies y quinolonas, ha sido elevada, a excepción de las obtenidas por la vía IG para danofloxacin en el caballo y por la vía SC para moxifloxacin (formulación de liberación sostenida) en conejo. Solamente existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las vías extravasculares de cada quinolona en el caballo, ya que la biodisponibilidad fue sensiblemente menor tras la administración IG de difloxacin y muy baja para danofloxacin tras la misma ruta de administración. También existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las administraciones extravasculares de difloxacin en la cabra y oveja.

Las quinolonas, en general, tienen una elevada biodisponibilidad en las diferentes especies animales por las distintas vías de administración, excepto en la administración oral, en la que dicha biodisponibilidad puede disminuir. Así, numerosos autores han publicado elevados valores de biodisponibilidad en diferentes especies y

con distintas quinolonas como vemos en la siguiente figura (Fernández- varón et al., 2005, Abd El-Aty y Goudah, 2002, Aliabadi y Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007):

**Figura 5: Valores de F de diversas fluoroquinolonas en varias especies.**



#### 10.2.2.7. CONCENTRACIÓN MÁXIMA ó $C_{m\acute{a}x}$

En la tabla siguiente se indican los valores de  $C_{m\acute{a}x}$ , en mg/L, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 12: Valores de  $C_{max}$  (mg/L) de las diversas fluorquinolonas, tras administraciones extravasculares, en las diversas especies.**

	Caballo		Oveja		Cabra		Conejo	
	I.M.	I.G.	I.M.	S.C.	I.M.	S.C.	I.M.	S.C.
<b>Difloxacino</b>	1.48	0.73	1.89	1.39	1.97	1.33		
<b>Danofloxacino</b>	0.35	0.21					1.87	1.79
<b>Orbifloxacino</b>					1.66	1.85	3.24	2.95
<b>Moxifloxacino</b>								1.61
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>								1.83

Podemos observar que tras la administración extravascular de difloxacino, las concentraciones máximas obtenidas en la cabra y en la oveja son similares, algo menores las obtenidas tras la administración IM en caballo, y la mitad de los valores obtenidos subcutáneamente en los pequeños rumiantes, son alcanzados tras la

administración IG en este mismo animal. Solamente existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la cabra entre las administraciones extravasculares. Fernández-Varón et al., (2007), ha publicado valores en el conejo de  $C_{\text{máx}}$  (Dosis: 5 mg/kg;  $C_{\text{máx-SC}} = 0.88$  mg/L y  $C_{\text{máx-OR}} = 0.76$  mg/L) similares a los obtenidos por nosotros en caballo tras la vía oral, e inferiores a los publicados en pequeños rumiantes tras la vía SC a la misma dosis.

En el caso de danofloxacino, las diferencias entre especies en este parámetro fueron más acentuadas, ya que las concentraciones máximas alcanzadas en conejo tras la administración IM fueron cinco veces superiores a las obtenidas en caballo. Esto puede explicarse probablemente porque la dosis empleada en conejo (dosis: 6 mg/kg) fue mayor que la empleada en el caballo (dosis: 1.25 mg/kg). La misma situación se repite para orbifloxacino entre la cabra y el conejo, ya que la dosis empleada en conejo (dosis: 5 mg/kg) fue el doble que la empleada en la cabra (dosis: 2.5 mg/kg), y por tanto en conejo se alcanzan valores de  $C_{\text{máx}}$  superiores. Solamente existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el caballo entre las administraciones extravasculares.

En el caso del moxifloxacino en el conejo, los valores de  $C_{\text{máx}}$  obtenidos tras las administraciones SC, indican que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los dos tipos de formulaciones. Esto podría explicarse porque, a pesar de que la dosis sea mayor en el caso de la formulación de liberación sostenida, esta formulación liberará lentamente el fármaco, dando lugar a  $C_{\text{máx}}$  no muy elevadas, pero duraderas en el tiempo. Otros autores han estudiado la farmacocinética de moxifloxacino a dosis de 5 mg/kg y han publicado diferentes valores de  $C_{\text{máx}}$  en caballo ( $C_{\text{máx-OR}} = 3.12$  mg/L; Gardner et al., 2004), cabra ( $C_{\text{máx-SC}} = 1.8$  mg/L y  $C_{\text{máx-IM}} = 2.82$  mg/L; Fernández-Varón et al., 2006b; Cárceles et al., 2007) y conejo ( $C_{\text{máx-OR}} = 1.23$  mg/L y  $C_{\text{máx-IM}} = 1.64$  mg/L; Fernández-Varón et al., 2005).

#### 10.2.2.8. TIEMPO MÁXIMO ó $t_{\text{máx}}$

Otro parámetro a tener en cuenta tras las administraciones extravasculares es el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima o tiempo máximo ( $t_{\text{máx}}$ ). El  $t_{\text{máx}}$  es independiente de la dosis administrada, pero sí se modifica en función de la forma farmacéutica administrada y la vía de administración, ya que depende de la constante de absorción. En la tabla siguiente se indican los valores de  $t_{\text{máx}}$ , en horas, obtenidos para cada quinolona y vía de administración en las especies estudiadas.

**Tabla 13: Valores de  $t_{\text{máx}}$  (h) de las diversas fluorquinolonas, tras administraciones extravasculares, en las diversas especies.**

	Caballo		Oveja		Cabra		Conejo	
	IM	IG	IM	SC	IM	SC	IM	SC
<b>Difloxacino</b>	2.76	2.34	2.42	5.33	1.79	3.37		
<b>Danofloxacino</b>	1.42	0.53					0.67	0.68
<b>Orbifloxacino</b>					0.87	1.25	0.65	0.67
<b>Moxifloxacino</b>								0.83
<b>Moxifloxacino SC-P407</b>								4.92

En el caso de difloxacino, el tiempo en que se alcanza la concentración máxima en caballo es muy similar entre las dos vías de administración extravasculares. Sin embargo, si observamos lo que ocurre en la oveja y en la cabra, el  $t_{\text{máx}}$  tras la administración IM se alcanza en la mitad de tiempo que tras la administración SC. En el conejo, las  $C_{\text{máx}}$  tras las administraciones extravasculares de difloxacino son alcanzadas más rápidamente ( $t_{\text{máx-OR}} = 1.02$  h y  $t_{\text{máx-SC}} = 0.96$  h; Fernández-Varón et al., 2007).

Para orbifloxacino, los valores de  $t_{\text{máx}}$  obtenidos son similares entre las distintas vías de administración de las especies estudiadas, solo es ligeramente superior el valor obtenido en la cabra tras la administración SC. Otros autores han publicado valores de  $t_{\text{máx}}$  tras la vía oral de 1.21 h en el caballo (Davis et al., 2006) y 2.42 h en el perro (Heinen, 2002).

Con los datos obtenidos para moxifloxacino, tras su administración SC en el conejo, podemos observar como el  $t_{\text{máx}}$  se ve modificado en función de la forma farmacéutica administrada, y así el valor de  $t_{\text{máx}}$  fue seis veces superior en el caso de la formulación de liberación sostenida. Otros autores han publicado valores de  $t_{\text{máx}}$  entre 0.50 y 2.42 h tras diferentes rutas de administración de moxifloxacino en el conejo, la oveja y la cabra (conejo:  $t_{\text{máx-OR}} = 0.55$  h y  $t_{\text{máx-IM}} = 0.50$  h; Fernández-Varón et al., 2005; oveja:  $t_{\text{máx-IM}} = 1.45$  h; Goudah, 2007; cabra:  $t_{\text{máx-IM}} = 1.70$  h y  $t_{\text{máx-SC}} = 2.42$  h; Fernández-Varón et al., 2006b; Cárceles et al., 2007).

Para danofloxacino, los valores de  $t_{\text{máx}}$  obtenidos son similares entre las distintas vías de administración de las especies estudiadas, solo es ligeramente superior el valor obtenido en el caballo tras la administración IM.

En general, podemos observar que los tiempos para alcanzar las concentraciones máximas son menores en el conejo que en el resto de especies estudiadas.

### **10.3. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO: LECHE (CABRA)**

#### **10.3.1. EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EN LECHE DE IBAFLOXACINO, DIFLOXACINO Y ORBIFLOXACINO.**

La evolución de las concentraciones experimentales de ibafloxacin, difloxacin y orbifloxacin, obtenidos en la leche de los animales tratados con una dosis intravenosa de 15, 5 y 2.5 mg/kg, respectivamente, se muestran en la figura 16.

La evolución de las concentraciones experimentales de difloxacin y orbifloxacin, obtenidas en la leche de los animales tratados con una dosis intramuscular de 5 y 2.5 mg/kg, respectivamente, se muestran en la figura 17, y en la figura 18 los correspondientes a la administración subcutánea.

En la figura 19 se representan los valores medios de concentración de orbifloxacin en leche, junto a las concentraciones plasmáticas medias, obtenidas tras la administración intramuscular, y en la figura 20 tras la administración subcutánea. En las figuras 21 y 22 aparecen las mismas representaciones pero para el difloxacin. Podemos observar como las concentraciones en leche se mantiene superiores a las plasmáticas durante un periodo de tiempo más prolongado, en el caso del orbifloxacin, y similares o algo inferiores en el caso de difloxacin, lo que en principio resulta muy interesante si se trata de luchar contra una mamitis.

La media ( $\pm$  SD) de los parámetros farmacocinéticos de las fluoroquinolonas en leche, obtenidos tras el análisis no compartimental, se muestran en la siguiente tabla.



**Tabla 14: Parámetros farmacocinéticos de las diversas fluoroquinolonas, obtenidos para la leche, en la cabra.**

	IBAFLOXACINO	DIFLOXACINO			ORBIFLOXACINO		
	IV	IV	IM	SC	IV	IM	SC
$C_{max}$ (mg/L)	0.82±0.30	2.12±0.5	1.28±0.19	1.20±0.17	1.56±0.18	1.77±0.23	1.73±0.30
$T_{max}$ (h)	1.00±0.00	1.17±0.41	2.67±1.03	4.00±0.00	1.83±0.37	2.00±0.00	2.00±0.00
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	2.37	5.62	6.38	4.50	1.84	1.94	1.93
AUC(mg·h/L)	3.12±3.03	10.42±2.19	10.75±1.65	9.58±1.58	6.36±0.70	7.43±1.27	7.58±2.61
$C_{max-m}/C_{max-p}$	-	-	0.67±0.14	0.90±0.07	-	1.05±0.21	0.95±0.20
$AUC_m/AUC_p$	0.20±0.01	0.66±0.01	0.65±0.09	0.68±0.03	1.02±0.14	1.21±1.09	1.15±0.17

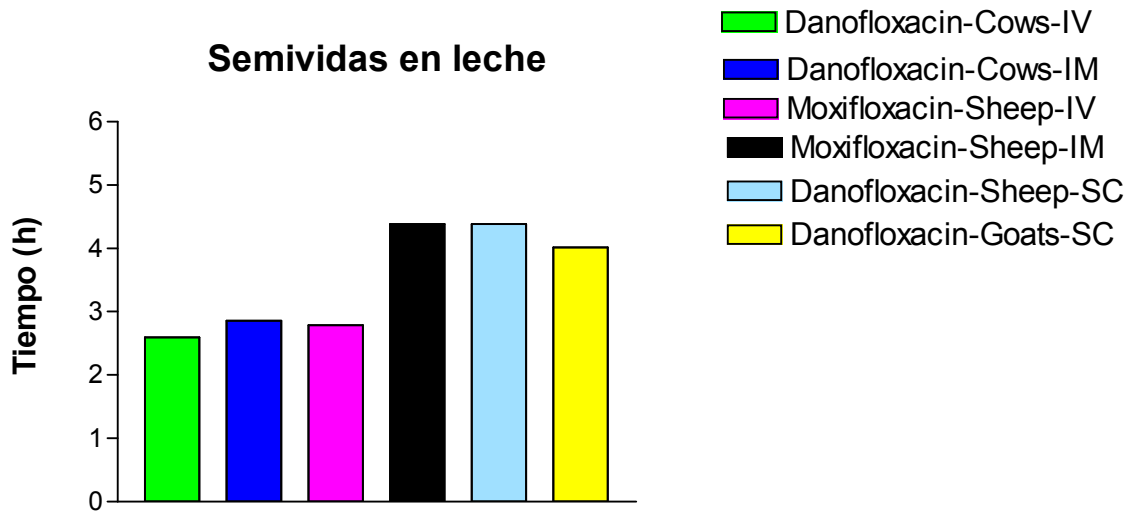
### 10.3.2. SEMIVIDAS

Las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) en leche obtenidas tras la administración intravenosa de orbifloxacino (1.84 h) e ibafloxacino (2.37 h), fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que la obtenida para difloxacino (5.62 h). Por lo que se puede entender que el difloxacino permanece durante mayor tiempo en leche, lo que puede ser, por un lado, un inconveniente, ya que precisará periodos de suspensión más prolongados, y, por otro lado, una ventaja si del tratamiento de una infección se trata. Entre estos valores estuvieron las semividas publicadas por otros autores, para moxifloxacino (2.17 h; Fernández-Varón et al., 2006b) y pefloxacino (2.75 h; Abd El-Aty y Goudah, 2002), en cabras lactantes. Al observar las semividas tras la administración IM y SC de difloxacino y orbifloxacino: el difloxacino presenta semividas significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores que el orbifloxacino, del orden de 3.3 veces superiores tras la administración IM y de 2.3 veces superiores tras la administración SC.

Si atendemos a la vía de administración, la vía IM presenta una semivida significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), 1.4 veces, que la SC, en el caso del difloxacino. Por lo que para este producto, si lo que interesa es obtener una permanencia más larga en la leche, será la vía preferida. Por el contrario, para el orbifloxacino, las semividas tras las administraciones IM y SC no muestran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), por lo que a este respecto, es indiferente la vía elegida.

Otros autores han publicado semividas para diferentes quinolonas similares a los valores obtenidos por nosotros (pefloxacino:  $t_{1/2\lambda z-IM} = 5.92$  h, Abd El-Aty y Goudah, 2002; moxifloxacino:  $t_{1/2\lambda z-IM} = 3.82$  h, Cárceles et al., 2007;  $t_{1/2\lambda z-SC} = 3.66$  h, Fernández-Varón et al., 2006b).

**Figura 6: Valores de  $t_{1/2\lambda z}$  (h) en leche de diversas fluoroquinolonas en varias especies** (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Escudero et al., 2007).



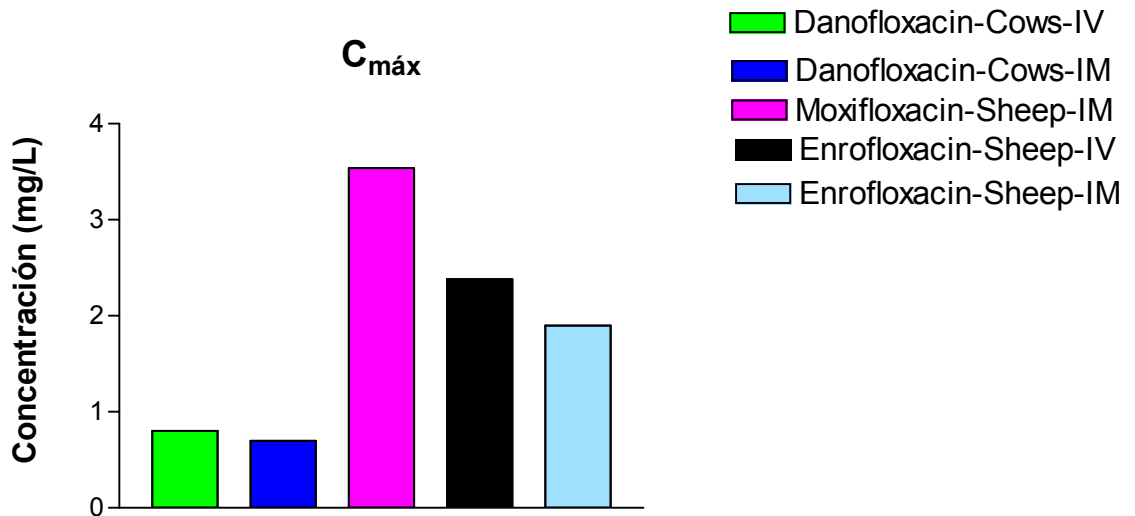
### 10.3.3. $C_{MAX}$

La  $C_{max}$  de las quinolonas que nos ocupan, muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), para la misma vía de administración, entre ibafloxacino, difloxacino y orbifloxacino. Sin embargo, al comparar las  $C_{max}$  de un mismo producto administrado por las distintas vías, en el caso del orbifloxacino no existen diferencias ( $p > 0.05$ ), y en el caso del difloxacino sólo existen diferencias entre la administración IV y las vías extravasculares, pero no entre la vía IM y la SC ( $p > 0.05$ ).

Para las tres vías, son mayores las  $C_{max}$  obtenidas para el orbifloxacino, por lo que de buscar una concentración más elevada, esta fluoroquinolona resulta ligeramente más ventajosa que el difloxacino.

Las  $C_{max}$  obtenidas son mayores que las obtenidas para pefloxacino ( $C_{máx-IM} = 0.77$  mg/L, Abd El-Aty y Goudah, 2002) y menores que las obtenidas para moxifloxacino ( $C_{máx-IM} = 3.94$  mg/L, Cárceles et al., 2007;  $C_{máx-SC} = 3.22$  mg/L, Fernández-Varón et al., 2006).

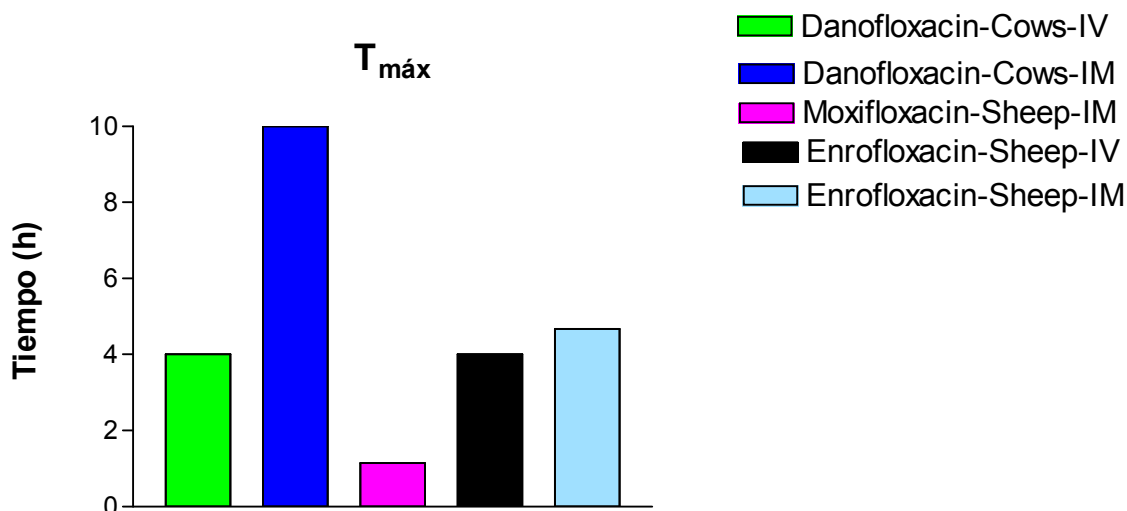
**Figura 7: Valores de  $C_{\text{máx}}$  (mg/L) en leche de diversas fluoroquinolonas en varias especies animales** (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Haritova et al., 2003).



#### 10.3.4. $t_{\text{MÁX}}$

Tras la administración IV sólo existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de  $t_{\text{max}}$  del ibafloxacin y del orbifloxacin, siendo éste último el que tiene un valor mayor (1.83 h). En cambio, tras la administración IM y SC, es el difloxacin el que tarda más en alcanzar la  $C_{\text{max}}$ . Más aún tras la administración SC. Por ello, si interesa obtener más rápidamente altas concentraciones en la leche, el orbifloxacin es más ventajoso que el difloxacin, pues además genera concentraciones más elevadas. Entre 1.9 y 3.67 h, se encuentran los valores de  $t_{\text{max}}$  obtenidos para otras quinolonas como pefloxacin (Abd El-Aty y Goudah, 2002) y moxifloxacin (Cárceles et al., 2007; Fernández-Varón et al., 2006b).

**Figura 8: Valores de  $t_{\text{máx}}$  (h) en leche de diversas fluoroquinolonas en varias especies (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Haritova et al., 2003).**



### 10.3.5. RATIOS $AUC_{\text{LE}}/AUC_{\text{PLAS}}$

Para evaluar la penetración de un fármaco en la leche se pueden utilizar dos ratios:  $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$  y  $C_{\text{max-leche}}/C_{\text{max-plasma}}$ .

Tras la administración IV, los valores de la ratio  $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$  indican una mejor penetración en leche del orbifloxacino (1.02), una buena penetración del difloxacino (0.66), y pobre en el caso del ibafloxacino (0.20). Si atendemos a las administraciones extravasculares, los valores de esta ratio no presentan diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) con respecto a los valores de la administración IV, por lo que lo dicho anteriormente es plenamente válido para las vías IM y SC. Para moxifloxacino y pefloxacino las ratios obtenidas fueron aún mayores (Abd El-Aty y Goudah, 2002; Cárceles et al., 2007; Fernández-Varón et al., 2006b).

### 10.3.6. RATIOS $C_{\text{max-le}}/C_{\text{max-plas}}$

En el caso que nos ocupa, el orbifloxacino presenta una mejor penetración y una concentraciones en leche mayores que el difloxacino, tanto cuando se administran por vía IM como SC.

En el caso del orbifloxacino, no existen diferencias ( $p > 0.05$ ) entre estas ratios tras la administración IM y SC. Sin embargo, en el caso del difloxacino, la administración SC logra una ratio ligeramente superior (1.3 veces) ( $p < 0.5$ ) que la

obtenida tras la administración IM. Esto indica que en caso de querer utilizar este antibiótico para tratar una mastitis, la vía SC podría ser más ventajosa. Sin embargo, debemos recordar que, esta misma vía, si bien da lugar a  $C_{max}$  semejantes a la administración IM, éstas aparecen más tardíamente sin alargarse su permanencia en la leche respecto a la administración IM, lo que puede ser una desventaja.

Ratios similares a las nuestras han sido publicadas para pefloxacino ( $C_{max-le}/C_{max-plas} = 0.9$ , Abd El-Aty y Goudah, 2002) y superiores para moxifloxacino tras la administración IM ( $C_{max-le}/C_{max-plas} = 1.68$ , Cárceles et al., 2007) y tras la administración SC ( $C_{max-le}/C_{max-plas} = 1.87$ , Fernández-Varón et al., 2006b).

#### 10.4. INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÁMICA: PK/PD

En el presente estudio se ha determinado la sensibilidad a danofloxacino y orbifloxacino de treinta cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de conejos con estafilococias crónicas en granjas comerciales. Como cepas de referencia se utilizaron *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922. En las tablas siguientes se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) obtenidas ( $\mu\text{g/mL}$ ) de danofloxacino y orbifloxacino:

**Tabla 15: MICs de danofloxacino obtenidas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (n=30)**

Especies	Origen	Número de cepas con una MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) de danofloxacino de													
		$\leq 0.03$	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
<i>S. aureus</i>	Conejo				5	10	9	1	3				2		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Control					x									
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control		x												

**Tabla 16: MICs de orbifloxacino obtenidas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (n=30)**

Especies	Origen	Número de cepas con una MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) de orbifloxacino de													
		$\leq 0.03$	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	$>128$
<i>S. aureus</i>	Conejo					17	7	3					3		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Control														x
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control		x												

Las fluoroquinolonas son un grupo de antibacterianos cuya actividad antimicrobiana es concentración dependiente, es decir, producen la muerte bacteriana en función de la concentración alcanzada. En consecuencia, los dos parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (PK-PD) que se correlacionan, con mayor frecuencia, con el éxito clínico en el tratamiento de una infección y con la aparición de mutantes resistentes son la ratio de concentración plasmática máxima  $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$  y la ratio área bajo la curva  $\text{AUC}/\text{CMI}$  (Xuan y et al., 2001).

Con modelos animales y diferentes quinolonas se ha observado que ratios  $\text{AUC}/\text{CMI} \geq 100-125$  o de  $C_{\text{máx}}/\text{CMI} \geq 8-10$  son buenas predictoras de eficacia clínica (Craig, 1998; Turnidge, 1999).

Las experiencias realizadas con éstos modelos han identificado la ratio  $\text{AUC}/\text{CMI}$  como el índice que mejor predice el éxito clínico, y la ratio  $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$  como el que mejor indica las dosis para evitar la aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002).

Por tanto, en el presente estudio, en conejo y para las cepas con las que se han obtenido las CMIs frente a danofloxacino y orbifloxacino, las ratios  $\text{AUC}/\text{CMI}$  y  $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$  obtenidas tras las administraciones intramuscular y subcutánea se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 17: Ratios de eficacia de danofloxacino a dosis de 6 mg/kg (n=6).

	Intramuscular	Subcutánea
<b>MIC<sub>50</sub> = 0.5 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	15.98 h	15.04 h
C <sub>max</sub> /MIC	3.74	3.58
<b>MIC<sub>90</sub> = 1 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	7.99 h	7.52 h
C <sub>max</sub> /MIC	1.87	1.79

Tabla 18: Ratios de eficacia de orbifloxacino a dosis de 5 mg/kg (n=6).

	Intramuscular	Subcutánea
<b>MIC = 0.5 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	13.5 h	14 h
C <sub>max</sub> /MIC	6.48	5.9
<b>MIC = 1 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	6.75 h	7 h
C <sub>max</sub> /MIC	3.24	2.95
<b>MIC = 2 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	3.38 h	3.5 h
C <sub>max</sub> /MIC	1.62	1.48

Podemos observar que estas ratios no predicen, *a priori*, el éxito clínico del tratamiento con estos quimioterápicos. Asimismo, las ratios C<sub>máx</sub>/CMI obtenidas por las vías extravasculares señalan, en principio, que no se previene la aparición de mutantes resistentes.

No obstante, hay que señalar que estos valores numéricos de AUC/CMI y C<sub>máx</sub>/CMI se han generado de infecciones experimentales en animales de laboratorio o

en pruebas clínicas en el hombre, por lo que pueden ser o no aplicables a infecciones en conejos, o en general, a infecciones en animales (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002). Sin embargo, corrigiendo las diferencias interespecíficas, a partir de estudios realizados con modelos animales *in vivo* se puede extrapolar y determinar el valor del parámetro PK-PD necesario para obtener eficacia antimicrobiana y disminuir el riesgo de aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002; Toutain y Lees, 2004).

Además, se debe tener en cuenta que el medio de cultivo empleado para obtener las CMI's utilizadas en la integración PK-PD, difiere en muchos aspectos de los fluidos biológicos (plasma y líquido intersticial). Por ejemplo, existen diferencias en la concentración de iones (calcio y magnesio, que pueden inactivar a ciertos antimicrobianos), el pH (que puede provocar la ionización de los fármacos y por tanto su menor penetración tisular) y la concentración proteica (sólo el fármaco libre posee acción antibacteriana) entre otros. Y por tanto, no se puede asumir que los valores de las CMI's obtenidas *in vitro* sean idénticas a las obtenidas utilizando los mencionados fluidos biológicos (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003).

Algunos autores han sugerido que valores de AUC/CMI, menores a 100, pueden ser apropiados en Medicina Veterinaria para animales inmunocompetentes. Lees y Shojaee Aliabadi (2002), tras la administración de danofloxacino en varias especies rumiantes en experiencias *ex vivo*, han observado valores de AUC/CMI inferiores para conseguir un efecto bacteriostático, bactericida o de erradicación bacteriana. Los datos que obtuvieron se muestran en la tabla siguiente:

AUC/CMI	Ternero	Oveja	Cabra	Camello
<b>Bacteriostático</b>	15,9 ± 2	17,8 ± 1,7	22,6 ± 1,7	17,2 ± 3,6
<b>Bactericida</b>	18,1 ± 1,9	20,2 ± 1,7	29,6 ± 2,5	21,2 ± 3,7
<b>Erradicación</b>	33,5 ± 3,5	28,7 ± 1,8	52,4 ± 8,1	68,7 ± 15,6



## **11.- RESULTS**

### 11.1. ANALYTICAL METHOD FOR IBAFLOXACIN DETERMINATION

Calibration curves used in this assay showed a linear response in the ranges of concentration of 10-100 and 100-2000 µg/L. The following calibration curves were obtained were:

- For range 10-100 µg/L:  $y = 0.000187(\pm 0.00) x - 7.5476(\pm 2.25)$ ,  $r^2 > 0.997$ .

- For range 100-2000 µg/L:  $y = 0.0002246(\pm 0.00) x - 5.7332(\pm 5.38)$ ,  $r^2 > 0.990$ .

The limit of quantification (LOQ) was 10 µg/L and the limit of detection (LOD) was 5 µg/L.

Mean ibafloxacin recovery values at different concentrations appear in the following table:

**Table 01: Mean recoveries of ibafloxacin.**

Concentration (µg/L)	Recovery (%)
	Mean ± S.D (n=5)
50	88.52 ± 5.61
250	105.52 ± 4.83
1000	94.21 ± 5.60

The intra-day repeatability was determined at three different concentrations, resulting, in all cases, relative standard deviations (RSD) less than 8%. The within-day precision and accuracy for the above-mentioned concentrations are presented in the following table:

**Table 02: Intra-day accuracy and precision values for ibafloxacin assay.**

Nominal Concentration (µg/L)	Obtained Concentration (µg/L) ± S.D	Accuracy (%) ± S.D	Precision R.S.D (%)
50	56.44 ± 4.04	112.89 ± 8.08	7.15
500	459.21 ± 21.99	91.84 ± 4.40	4.78
1000	976.65 ± 57.65	97.66 ± 5.77	5.90

The inter-day repeatability was also assessed with the same concentrations and the resulting RSD was approximately 4 %. Inter-day accuracy and precision at these concentrations are shown in the following table:

**Table 03: Inter-day accuracy and precision values for ibafloxacin assay.**

<b>Nominal Concentration (µg/L)</b>	<b>Obtained Concentration (µg/L) ± S.D</b>	<b>Accuracy (%) ± S.D</b>	<b>Precision R.S.D (%)</b>
50	54.03 ± 2.18	108.05 ± 4.36	4.03
500	456.65 ± 6.03	91.71 ± 1.21	1.32
1000	927.37 ± 34.10	92.73 ± 3.41	3.68

The interference of ibafloxacin with other fluoroquinolonas was evaluated using this method. Danofloxacin, difloxacin, moxifloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin were not detected using the conditions detailed in the methodology, probably because at the fixed excitation and emission wavelengths, these quinolones are not detectable. Therefore, none of them can be used as internal standard.

## **11.2. PHARMACOKINETIC ANALYSIS**

### **11.2.1 PHARMACOKINETIC MODEL**

After compartmental analysis, the fates of plasma concentrations after intravenous administration, in all cases, were best described by a two-compartment open model. This model agrees with fluoroquinolone features which penetrate to intracellular level (Brown, 1996). This compartmental disposition after intravenous administration is in agreement with those previously reported for moxifloxacin in goats and rabbits (Fernandez-Varón et al., 2006b; 2005) and perhaps in man, monkeys, dogs and guinea pigs, as can be inferred from the plasma concentration-time curves presented by Siefert et al., (1999). Danofloxacin (Aliabadi and Lees, 2001), marbofloxacin (Waxman et al., 2001), pefloxacin (Abd El-Aty and Goudah, 2002) and enrofloxacin (Abo El-Sooud, 2003) are also best described by a two-compartment model after intravenous administration.

Extravascular administrations are best described, depending on the case, by one- or two-compartment models. Often, when the intravenous disposition of a specific drug follows a two-compartment model, after its administration by the extravascular route its disposition fits better to a one-compartment model. This is the case with moxifloxacin in rabbits (Fernández-Varón et al., 2005). In the fast disposition phase after intravenous

administration, the disappearance of the drug from the plasma is ruled by first order kinetics, which is directly proportional to plasma concentration. At minor concentrations, the speed diminishes and it is possible that this first phase does not manage to demonstrate fully. In addition, it can be masked by other processes such as absorption.

These results are summarized in the following table. Moxifloxacin was not analyzed by compartmental pharmacokinetics, since it was previously studied in our lab and here a new line of research begins: the use of prolonged release formulations. Compartmental analysis was not suitable for describing disposition of difloxacin administered by extravascular routes in sheep, neither ibafloxacin after intravenous administration in rabbits.

**Table 04: Compartmental pharmacokinetic models describing the disposition of various fluoroquinolones in the studied species.**

	Horse			Sheep			Goats			Rabbits		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacin (5 mg/kg)</b>	2	1	1	2	-	-	2	2	2			
<b>Danofloxacin</b>	2	1	2							2	1	1
<b>Orbifloxacin</b>							2	2	2	2	2	2
<b>Ibafloxacin (15 mg/kg)</b>							2			-		

1: one-compartment model

2: two- compartment model

Mean plasma concentrations ( $\pm$  SD) of ibafloxacin, moxifloxacin, difloxacin, danofloxacin and orbifloxacin at the times of sample collection after the different routes of administration in the various animal species are shown in figures 1-15. The following table details the number of the figure that corresponds to every concrete case.

**Table 05: Number of figures depending on the fluoroquinolone and the route of administration.**

	Horse			Sheep			Goats			Rabbits		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	7	8	9	4	5	6	1	2	3			
<b>Danofloxacin</b>	10	11	12							13	14	15
<b>Orbifloxacin</b>							1	2	3	13	14	15
<b>Moxifloxacin</b>										13		15
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>												15
<b>Ibafloxacin</b>							1			13		

## 11.2.2 PHARMACOKINETIC PARAMETERS

### 11.2.2.1. HALF-LIFE OR $t_{1/2\lambda_z}$

The half-life of the slow disposition phase ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) is considered the real half-life of a “two-compartment” drug, as  $\lambda_z$  is the hybrid constant that mainly controls all the disposition process (Atkinson and Kushner, 1979; Gibaldi and Perrier, 1982). The intravenous half-life is the representative parameter as is not influenced by other processes. In the following table, the values of  $t_{1/2\lambda_z}$ , in hours, are indicated for every quinolone and route of administration in the studied species.

**Table 06: Half-lives (hours) of the fluoroquinolones after various routes of administration in the studied species.**

	Horse			Sheep			Goats			Rabbits		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	2.66	5.72	10.75	11.43	13.89	12.02	4.92	10.44	7.33			
<b>Danofloxacin</b>	6.31	5.36	4.74							4.88	6.70	8.20
<b>Orbifloxacin</b>							4.12	3.34	4.99	2.50	2.54	5.14
<b>Moxifloxacin</b>										2.15		5.41
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>												11.09
<b>Ibafloxacin</b>							3.76			2.85		

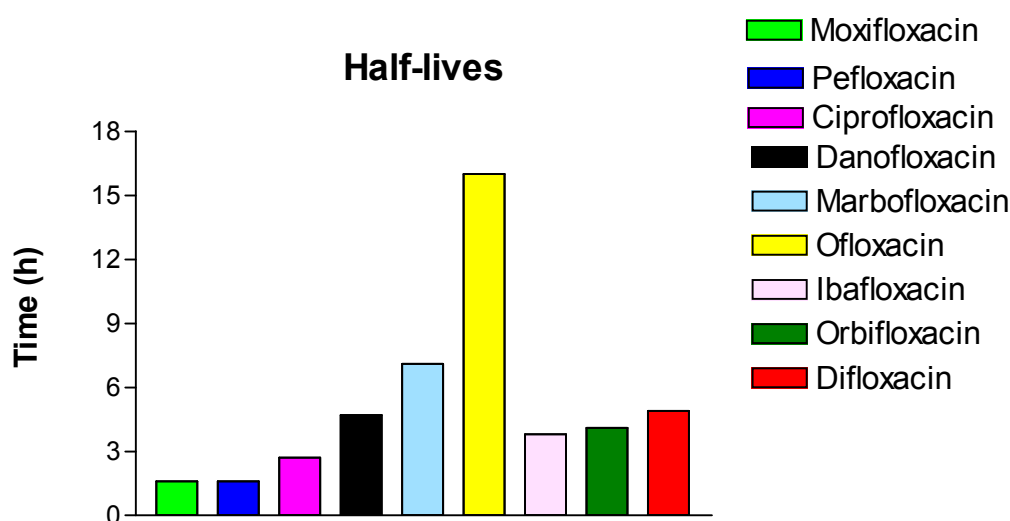
In horses, danofloxacin showed a value of half-life 2.4 times greater than difloxacin after intravenous administration. But this difference diminished when both fluoroquinolones were administered intramuscularly; in this case the half-lives were nearly equal. On the other hand, the IG administration inverts that happened after the IV administration, so that the half-life of difloxacin was, in this case, almost twice longer than that of danofloxacin. All suggests that when the IM route is chosen, this parameter do not differ between difloxacin and danofloxacin. Nevertheless, if the IG administration is used the advantages of difloxacin seem to be evident.

In sheep, only difloxacin was studied. The results indicated that half-life did not differ significantly ( $p > 0.5$ ) after IM and SC administration.

In goats, the half-lives after IV administration of difloxacin and orbifloxacin (4.92 and 4.12 h, respectively) were similar and slightly longer than that obtained for ibafloxacin (3.76 h). With regard to other fluoroquinolones in goats, half-life values ranging between 1.6 and 15.5 h have been described (Fernández- varón et al., 2006b, Abd El-Aty and Goudah, 2002, El Banna and Abo El-Sooud, 1998, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Baruah et al., 2004, Marín et al., 2007a, Marín et al., 2007b, Marín et al., 2007c).

If we attend to the half-lives obtained after extravascular administration, it was verified that orbifloxacin showed significant differences between SC and IM administration ( $p < 0.05$ ), but not among IV and the extravascular routes ( $p > 0.05$ ). In the case of difloxacin significant differences were demonstrated among the extravascular administrations and the IV administration ( $p < 0.05$ ), being the IM half-life almost 1.5 times greater than that after SC administration and more of the double than that for the IV route.

**Figure 01: Half-lives of different fluoroquinolones after intravenous administration in goats** (Fernández- varón et al., 2006b, Abd El-Aty and Goudah, 2002, El Banna and Abo El-Sooud, 1998, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Baruah et al., 2004, Marín et al., 2007a, Marín et al., 2007b, Marín et al., 2007c).



In rabbits, danofloxacin after intravenous administration showed a half-life almost twice longer than those of moxifloxacin, orbifloxacin and ibafloxacin. After SC administration, the half-life of the long-acting formulation of moxifloxacin showed the longest value ( $p < 0.05$ ), presenting advantages over the other formulations.

Danofloxacin, also showed a prolonged half-life after SC administration (8.20), this value is greater than those obtained for other fluoroquinolones in rabbits (Marangos et al., 1997; Fernández-Varón et al., 2007).

#### 11.2.2.2. MEAN RESIDENCE TIME or MRT

The non-compartmental pharmacokinetic analysis allows to calculate the mean residence time (MRT). This parameter is independent from the chosen pharmacokinetic

model and has an analogous meaning as half-life in compartmental models. The following table shows the values of MRT (in hours) for every quinolone and route of administration dependig on the species.

**Table 07: MRT (h) values of the studied fluoroquinolones in various animal species after different routes of administration.**

	Horse			Sheep			Goats			Rabbits		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	3.67	5.03	4.45	8.07	15.83	12.62	3.59	8.92	7.26			
<b>Danofloxacin</b>	6.17	8.12	6.46							4.14	5.05	4.73
<b>Orbifloxacin</b>							2.75	2.82	3.58	1.88	2.36	2.80
<b>Moxifloxacin</b>										2.61		5.21
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>												7.99
<b>Ibafloxacin</b>							1.50			1.03		

In rabbits, MRT of danofloxacin after IV administration was higher than those obtained for orbifloxacin, moxifloxacin and ibafloxacin. MRT values of danofloxacin after IV and IM administration were twice times higher than those for moxifloxacin and orbifloxacin. After SC administration MRT for moxifloxacin and danofloxacin were similar, moxifloxacin (long-acting formulation) reached the longest value and orbifloxacin the shortest one.

Significant differences were found ( $p < 0.05$ ) in MRT values among extravascular routes and IV administration of orbifloxacin, and between IM and IV administrations of danofloxacin.

Other authors have reported the pharmacokinetics of several fluoroquinolones in rabbits, but only some of them have calculated the MRT. For example, Fernández-Varón et al., (2005, 2007), reported a MRT value for moxifloxacin after IV administration (2.44 h) similar to our data, and for difloxacin (MRT = 4.82 h y 5.18 h, after IV and SC administration, respectively) similar values to those obtained for danofloxacin in our study.

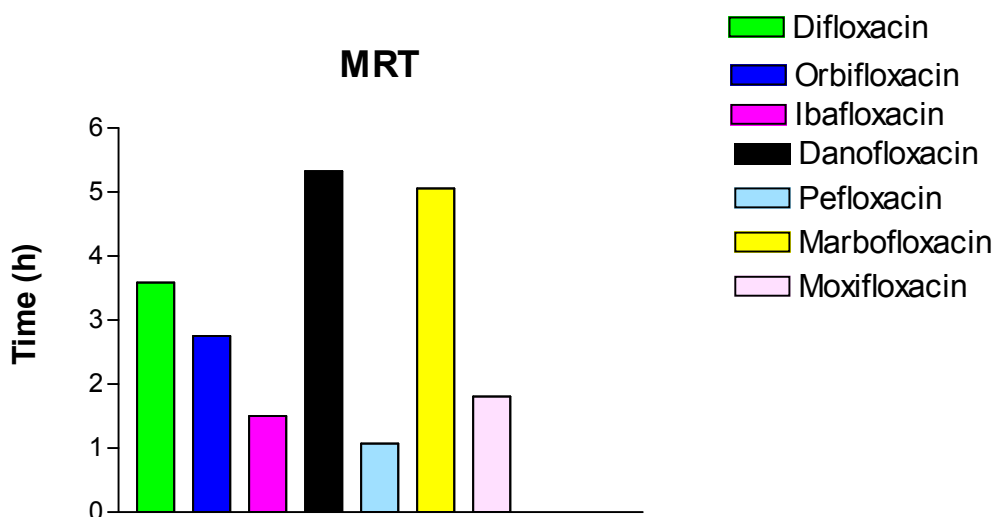
In sheep, significant differences were found ( $p < 0.05$ ) in MRTs among extravascular routes and IV administration of difloxacin. These values were higher than those reported for enrofloxacin (MRT<sub>IV</sub> = 4.81 h and MRT<sub>IM</sub> = 4.52 h; Haritova et al., 2003), danofloxacin (MRT<sub>IV</sub> = 4.45 h and MRT<sub>IM</sub> = 5.45 h; McKellar et al., 1998) and moxifloxacin (MRT<sub>IV</sub> = 2.36 h and MRT<sub>IM</sub> = 4.68 h; Goudah, 2007).

In horses, MRT values for difloxacin were lower than those for danofloxacin. Moreover, significant differences were not found ( $p > 0.05$ ) for danofloxacin among the different routes of administration, while MRT of difloxacin differed significantly ( $p < 0.05$ ) among extravascular routes and IV administration. Other authors have reported MRTs similar to the values presented in our study, for example for marbofloxacin ( $MRT_{IV} = 5.96$  h,  $MRT_{IM} = 6.91$  h and  $MRT_{OR} = 8.97$  h; Carretero et al., 2002; Bousquet-Melou et al., 2002) and orbifloxacin ( $MRT_{IV} = 5.81$  h and  $MRT_{OR} = 5.2$  h; Davis et al., 2006).

In goats, MRTs for difloxacin and orbifloxacin (3.59 and 2.75 h, respectively) after IV administration were similar, however ibafloxacin MRT was shorter than the above mentioned data. Significant differences were found ( $p < 0.05$ ) among extravascular routes and IV administration for orbifloxacin and difloxacin.

Other authors have reported MRT values in goats ranging from 1.07 to 5.33 hours, data of previously papers are presented in the following figure (Fernández- varón et al., 2006, Abd El-Aty and Goudah, 2002, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2004, Marín et al., 2007a, Marín et al., 2007b, Marín et al., 2007c):

**Figure: 02: MRT values for different quinolones in goats after intravenous administration**





### 11.2.2.3. APPARENT VOLUME OF DISTRIBUTION AT STEADY STATE

( $V_{ss}$ )

The values of the apparent volumes of distribution at steady state ( $V_{ss}$ ), expressed as L/kg, for each quinolone in the studied species are shown in the following table.

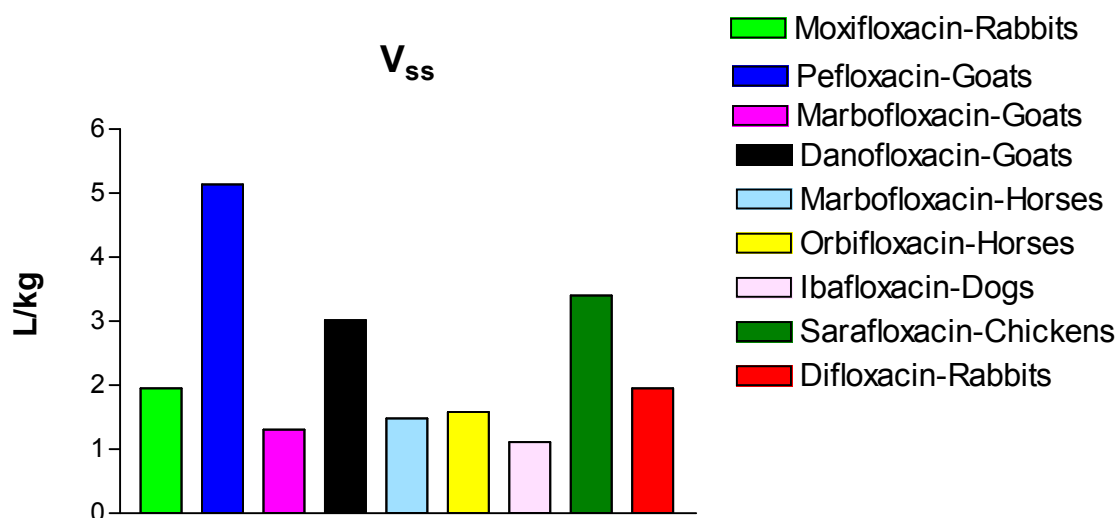
**Table 08:  $V_{ss}$  values (L/kg) obtained for different quinolones in the studied species.**

	Horse	Sheep	Goat	Rabbit
<b>Difloxacin</b>	1.02	1.68	1.16	
<b>Danofloxacin</b>	2.00			3.16
<b>Orbifloxacin</b>			1.13	1.71
<b>Moxifloxacin</b>				2.08
<b>Ibafloxacin</b>			1.65	5.09

All the obtained  $V_{ss}$  values were  $> 1$  L/kg, therefore it suggested a good distribution in tissues of these fluoroquinolones. In goats,  $V_{ss}$  values were similar for the three quinolones, however in rabbits,  $V_{ss}$  values for ibafloxacin and danofloxacin were higher than those of orbifloxacin and moxifloxacin. In horses,  $V_{ss}$  for danofloxacin was twice times higher than that for difloxacin.

In other species, quinolones have also showed a wide distribution. Data of previously published papers are presented in the following figure (Fernández- varón et al., 2005, Abd El-Aty and Goudah, 2002, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007):

**Figure 03:  $V_{ss}$  values for different quinolones in several species.**



#### 11.2.2.4. CLEARANCE (Cl)

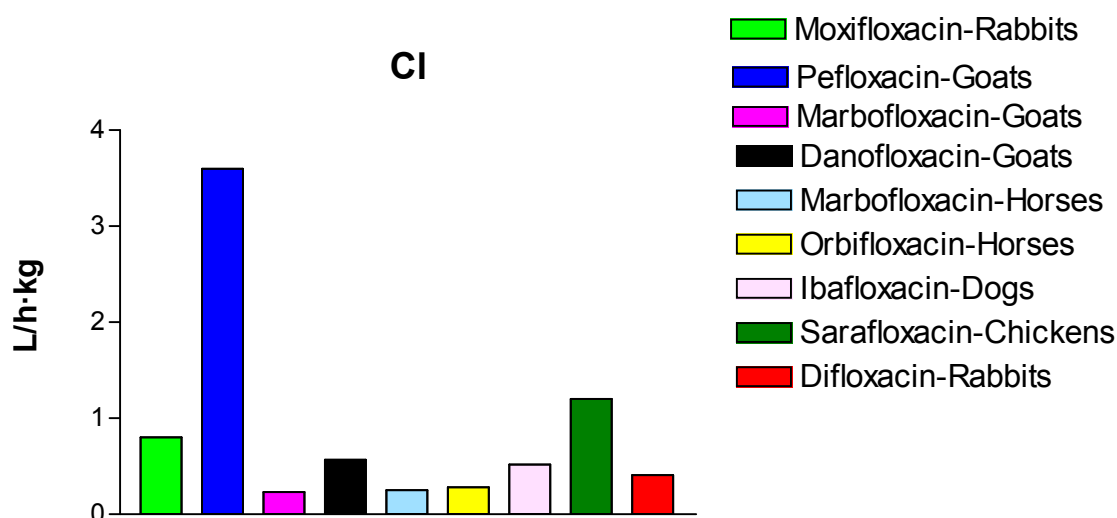
Clearance values, expressed as L/h·kg, obtained for each quinolone in the studied species are shown in the following table.

**Table 09: Clearance values obtained for different quinolones in the studied species.**

	Horse	Sheep	Goat	Rabbit
<b>Difloxacin</b>	0.28	0.21	0.32	
<b>Danofloxacin</b>	0.34			0.76
<b>Orbifloxacin</b>			0.40	0.91
<b>Moxifloxacin</b>				0.78
<b>Ibafloxacin</b>			1.05	5.83

Clearance values for difloxacin in goats, sheep and horses were similar to those obtained previously in rabbits ( $Cl = 0.41$  L/h·kg, Fernández-Varón et al., 2007) and calves ( $Cl = 0.13$  L/h·kg, Ismail, 2007). However, clearance values for danofloxacin, ibafloxacin and orbifloxacin in rabbits were higher than those of the species with greater bodyweights in the present work. Other authors have reported clearance values in different species and for different quinolones, their data are plotted in the figure 04 (Fernández- varón et al., 2005, Abd El-Aty and Goudah, 2002, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007).

**Figure 04: Clearance values for different quinolones in several species.**



### 11.2.2.5. AREA UNDER THE PLASMA CONCENTRATION-TIME CURVE (AUC)

Area under the plasma concentration-time curve (AUC) is a parameter that allows to calculate the clearance and bioavailability of a drug. This parameter can be calculated by compartmental or non-compartmental analysis. The values presented here are determined by non-compartmental methods.

AUC values, in mg·h/L, obtained for each quinolone in the studied species are shown in the following table.

**Table 10: AUC values obtained for different quinolones in the studied species**

	Horse			Sheep			Goat			Rabbit		
	IV	IM	IG	IV	IM	SC	IV	IM	SC	IV	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	18.37	17.61	12.52	24.23	23.62	19.40	15.84	16.70	14.17			
<b>Danofloxacin</b>	3.80	3.32	0.86							8.00	8.19	7.68
<b>Orbifloxacin</b>							6.15	5.98	6.47	5.74	6.75	7.00
<b>Moxifloxacin</b>										6.66		7.67
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>												14.52
<b>Ibafloxacin</b>							15.19			2.61		

The AUC obtained for difloxacin (dose: 5 mg/kg) after IV administration to horses was five times greater than that of danofloxacin (dose: 1.25 mg/kg), and fourteen times greater than that of danofloxacin after IG administration. Significant differences in AUC ( $p < 0.05$ ) were found between IV and IG administrations of each quinolone, and between both extravascular administrations of danofloxacin. Other authors have obtained AUC values for other fluoroquinolones similar to these presented here, such orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg;  $AUC_{IV} = 9.04$  mg·h/L and  $AUC_{IM} = 6.16$  mg·h/L; Davis et al., 2006), marbofloxacin (dose: 2 mg/kg;  $AUC_{IV} = 8.26$  mg·h/L,  $AUC_{OR} = 5.11$  mg·h/L and  $AUC_{SC} = 7.94$  mg·h/L; Bousquet-Melou et al., 2002) and norfloxacin (dose: 4 mg/kg;  $AUC_{IV} = 8.26$  mg·h/L and  $AUC_{OR} = 4.69$  mg·h/L; Park and Yun, 2003).

In sheep, AUC values after the three routes of administration for difloxacin (dose: 5 mg/kg) were high. For the same quinolone and dose, AUC values were lower in goats. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between extravascular administrations in both species.

The AUC value obtained for ibafloxacin (dose: 15 mg/kg) after IV administration in goats was similar to the value obtained for difloxacin (5 mg/kg) at a lower dose, and greater than the value obtained in rabbits for ibafloxacin at the same dose (15 mg/kg).

Although different doses were used for orbifloxacin, AUC values were similar in goats and rabbits. Significant differences ( $p > 0.05$ ) were not found among AUC values in goats, and significant differences ( $p < 0.05$ ) were found among IV administration and extravascular routes in rabbits.

AUC values obtained in rabbits for danofloxacin (dose: 6 mg/kg) were similar after the three routes of administration and significant differences ( $p > 0.05$ ) were not found. In the same specie, AUC values for moxifloxacin (dose: 5 mg/kg) were also similar, except the AUC value obtained with the long-acting formulation, that was greater.

#### 11.2.2.6. BIOAVAILABILITY (F)

Bioavailability values (%), for each quinolone in the studied species, are shown in the following table.

**Table 11: Bioavailability (%) values for different quinolones, after different routes of administration, in the studied species.**

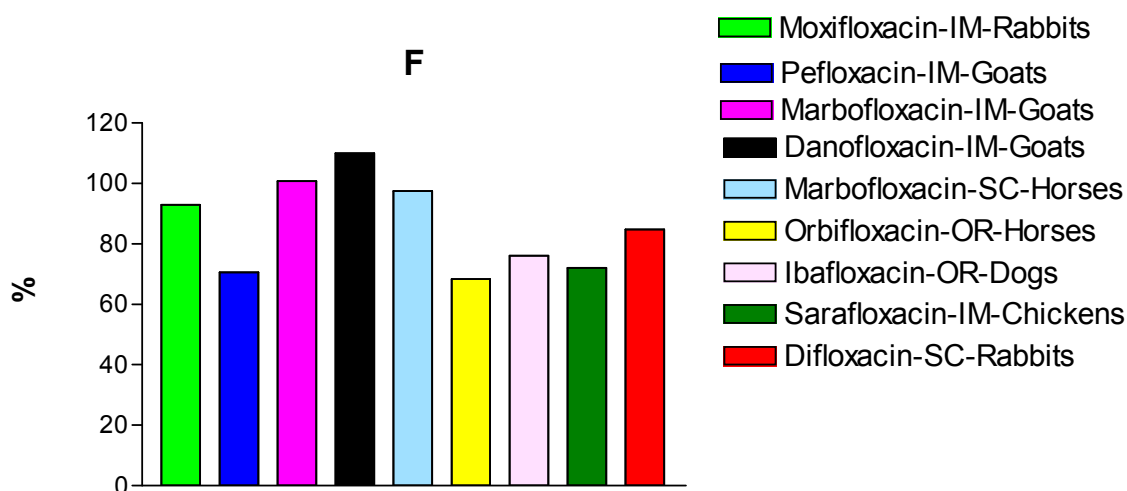
	Horse		Sheep		Goat		Rabbit	
	IM	IG	IM	SC	IM	SC	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	95.81	68.62	99.92	82.35	106.79	90.16		
<b>Danofloxacin</b>	88.48	22.36					102.34	96.44
<b>Orbifloxacin</b>					105.01	108.96	109.87	110.67
<b>Moxifloxacin</b>								117.00
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>								44.00

The obtained bioavailabilities after different routes of administration, in the various studied species and for different quinolones, were high, except for those obtained after IG administration of danofloxacin to horses and after SC administration of moxifloxacin long-acting formulation to rabbits. Only significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the extravascular routes of each quinolone in horses and between extravascular routes for difloxacin in goats and sheep.

In general, quinolones have high bioavailabilities in the various animal species after different routes of administration, except for oral administration, where bioavailability could diminish. Numerous authors have reported similar high bioavailability values in

different species and for different quinolones (Fernández-Varón et al., 2005, Abd El-Aty and Goudah, 2002, Aliabadi and Lees, 2001, Waxman et al., 2001, Carretero et al., 2002, Davis et al., 2006, Coulet et al., 2002, Ding et al., 2001, Fernández-Varón et al., 2007). These data are plotted in figure 05:

**Figure 05: Bioavailability values for different quinolones in several species.**



#### 11.2.2.7. MAXIMUM OR PEAK PLASMA CONCENTRATION ( $C_{\max}$ )

Maximum plasma concentration values ( $C_{\max}$ ), in mg/L, obtained for each quinolone in the studied species and depending on the extravascular route are shown in the following table.

**Table 12:  $C_{\max}$  values obtained for different quinolones, after extravascular administration, in the studied species.**

	Horse		Sheep		Goat		Rabbit	
	IM	IG	IM	SC	IM	SC	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	1.48	0.73	1.89	1.39	1.97	1.33		
<b>Danofloxacin</b>	0.35	0.21					1.87	1.79
<b>Orbifloxacin</b>					1.66	1.85	3.24	2.95
<b>Moxifloxacin</b>								1.61
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>								1.83

After extravascular administration of difloxacin, it was evident that peak concentrations in goats and sheep were similar, and higher than those obtained in horses. Only significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between those values after extravascular administrations in goats. Fernández-Varón et al., (2007), have reported  $C_{\max}$  values of

difloxacin in rabbits ( $C_{\text{m}ax\text{-SC}} = 0.88 \text{ mg/L}$  and  $C_{\text{m}ax\text{-OR}} = 0.76 \text{ mg/L}$ ) similar to the present values after IG administration in horses at the same dose.

For danofloxacin,  $C_{\text{m}ax}$  values differed more between species, as the maximum concentration reached in rabbits after IM administration was five times higher than that obtained in horses. Probably it can be explained because the dose used in rabbits (dose: 6 mg/kg) was higher than that administered to horses (dose: 1.25 mg/kg). It also happens for orbifloxacin in goats and rabbits, as the dose used in rabbits (dose: 5 mg/kg) was twice higher than the dose used in goats (dose: 2.5 mg/kg), therefore the obtained  $C_{\text{m}ax}$  values are higher in rabbits. Only significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between both extravascular administrations in horses.

Significant differences ( $p > 0.05$ ) were not found between SC administrations of the conventional and long-acting formulation of moxifloxacin in rabbits. Probably it can be explained because, although the dose of the long-acting formulation was higher, moxifloxacin was delivered slower from the long-acting formulation compared to the conventional one, so  $C_{\text{m}ax}$  values were not very high, but lasting in time. Other authors have reported  $C_{\text{m}ax}$  values of moxifloxacin at the same dose higher in horses ( $C_{\text{m}ax\text{-OR}} = 3.12 \text{ mg/L}$ ; Gardner et al., 2004) and goats ( $C_{\text{m}ax\text{-IM}} = 2.82 \text{ mg/L}$ ; Cárceles et al., 2007), similar values in goats ( $C_{\text{m}ax\text{-SC}} = 1.8 \text{ mg/L}$ ; Fernández-Varón et al., 2006b) and lower in rabbits ( $C_{\text{m}ax\text{-OR}} = 1.23 \text{ mg/L}$  and  $C_{\text{m}ax\text{-IM}} = 1.64 \text{ mg/L}$ ; Fernández-Varón et al., 2005) than the data presented here.

#### 11.2.2.8. TIME OF MAXIMUM PLASMA CONCENTRATION ( $T_{\text{m}ax}$ )

After extravascular administration, other important parameter is the time to reach peak or maximum plasma concentration ( $t_{\text{m}ax}$ ).  $T_{\text{m}ax}$  values (h) obtained for each quinolone in the studied species are shown in the following table.

**Table 13:  $T_{\text{m}ax}$  values obtained for different quinolones, after extravascular routes of administration, in the studied species.**

	Horse		Sheep		Goat		Rabbit	
	IM	IG	IM	SC	IM	SC	IM	SC
<b>Difloxacin</b>	2.76	2.34	2.42	5.33	1.79	3.37		
<b>Danofloxacin</b>	1.42	0.53					0.67	0.68
<b>Orbifloxacin</b>					0.87	1.25	0.65	0.67
<b>Moxifloxacin</b>								0.83
<b>Moxifloxacin SC-P407</b>								4.92

The time to reach maximum plasma concentration for difloxacin in horses is similar after both extravascular administrations. However, the  $t_{\max}$  after IM administration in sheep and goats is reached at a half time than after SC administration, indicating a faster rate of absorption after IM injection. In rabbits, the  $C_{\max}$  of difloxacin after extravascular administrations are reached quicker than in other species ( $T_{\max\text{-OR}} = 1.02$  h and  $T_{\max\text{-SC}} = 0.96$  h; Fernández-Varón et al., 2007).

For orbifloxacin, the times to reach maximum plasma concentrations were similar after extravascular administration in the different studied species. Only  $t_{\max}$  after SC administration in goats was slightly longer. Other authors have reported  $t_{\max}$  values after OR administration in dogs ( $T_{\max} = 2.42$  h, Heinen, 2002) longer than those presented here for IM and SC administrations, indicating a delayed absorption in the case of the oral administration.

We can observe that the  $t_{\max}$  of moxifloxacin was affected by the pharmaceutical formulation, as  $t_{\max}$  values were six times longer for the long-acting formulation compared to the conventional. Other authors have reported  $t_{\max}$  values ranging between 0.50 h and 2.42 h after different routes of administration of moxifloxacin in rabbits, sheep and goats (rabbits:  $T_{\max\text{-OR}} = 0.55$  h and  $T_{\max\text{-IM}} = 0.50$  h; Fernández-Varón et al., 2005; sheep:  $T_{\max\text{-IM}} = 1.45$  h; Goudah, 2007; goats:  $T_{\max\text{-IM}} = 1.70$  h and  $T_{\max\text{-SC}} = 2.42$  h; Fernández-Varón et al., 2006b; Cárceles et al., 2007).

For danofloxacin, the times to reach peak concentration were similar after extravascular administrations in the different species. Only  $t_{\max}$  after IM administration in horses was slightly longer.

In general, the time to reach maximum plasma concentrations is lower in rabbits than in the other species of the present study.

### 11.3. PHARMACOKINETIC STUDY: MILK (GOATS)

#### 11.3.1. MILK CONCENTRATIONS OF IBAFLOXACIN, DIFLOXACIN AND ORBIFLOXACIN.

The mean ( $\pm$ SD) milk concentrations of ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin following IV administration, at a dose of 15, 5 and 2.5 mg/kg, respectively, are plotted in figure 16.

The mean ( $\pm$ SD) milk concentrations of difloxacin and orbifloxacin following IM administration, at a dose of 5 and 2.5 mg/kg, respectively, are plotted in figure 17.

The mean ( $\pm$ SD) milk concentrations of difloxacin and orbifloxacin following SC administration, at a dose of 5 and 2.5 mg/kg, respectively, are plotted in figure 18.

The mean ( $\pm$ SD) plasma and milk concentrations of orbifloxacin following IM and SC administration are plotted in figures 19 and 20, respectively. The mean ( $\pm$ SD) plasma and milk concentrations of difloxacin following IM and SC administration are plotted in figures 21 and 22, respectively. We can observe that milk concentrations of orbifloxacin are maintained above plasma concentrations during a long period of time, this is not the case for difloxacin or ibafloxacin. For difloxacin, plasma and milk concentration-time curves were similar. This fact is interesting for a potential usefulness in mammary gland infections in this specie.

Milk pharmacokinetic parameters (mean  $\pm$  SD) of ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin in lactating goats are shown in the following table.

**Table 14: Milk pharmacokinetic parameters (mean  $\pm$  SD) of ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin in lactating goats**

	IBAFLOXACIN	DIFLOXACIN			ORBIFLOXACIN		
	IV	IV	IM	SC	IV	IM	SC
$C_{max}$ (mg/L)	0.82 $\pm$ 0.30	2.12 $\pm$ 0.5	1.28 $\pm$ 0.19	1.20 $\pm$ 0.17	1.56 $\pm$ 0.18	1.77 $\pm$ 0.23	1.73 $\pm$ 0.30
$T_{max}$ (h)	1.00 $\pm$ 0.00	1.17 $\pm$ 0.41	2.67 $\pm$ 1.03	4.00 $\pm$ 0.00	1.83 $\pm$ 0.37	2.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	2.37	5.62	6.38	4.50	1.84	1.94	1.93
AUC(mg·h/L)	3.12 $\pm$ 3.03	10.42 $\pm$ 2.19	10.75 $\pm$ 1.65	9.58 $\pm$ 1.58	6.36 $\pm$ 0.70	7.43 $\pm$ 1.27	7.58 $\pm$ 2.61
$C_{max-m}/C_{max-p}$	-	-	0.67 $\pm$ 0.14	0.90 $\pm$ 0.07	-	1.05 $\pm$ 0.21	0.95 $\pm$ 0.20
$AUC_m/AUC_p$	0.20 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.14	1.21 $\pm$ 1.09	1.15 $\pm$ 0.17



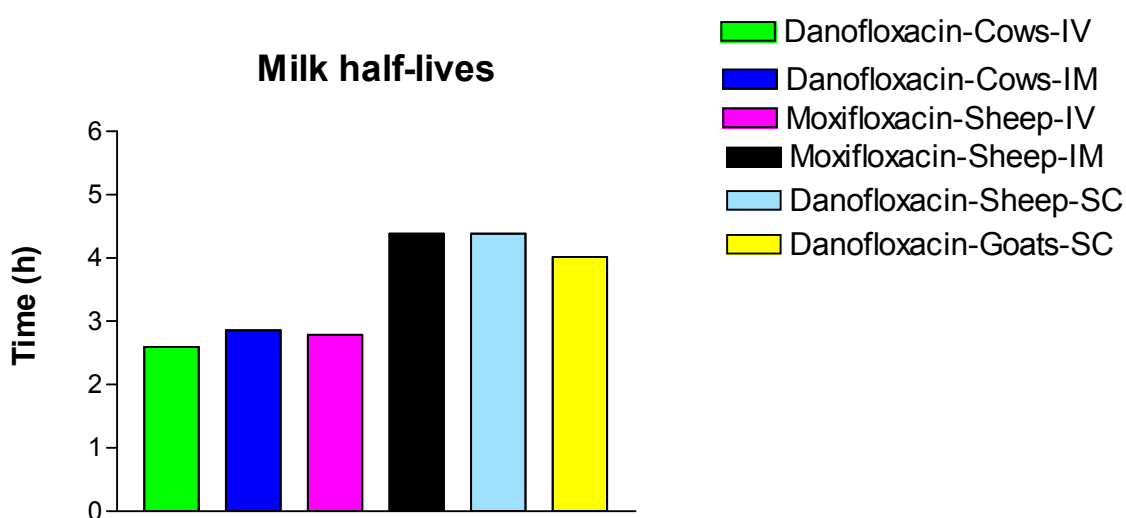
### 11.3.2. HALF-LIVES

The half-lives ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) obtained in milk after IV administration of orbifloxacin (1.84 h) and ibafloxacin (2.37 h), were significantly shorter ( $p < 0.05$ ) than that for difloxacin (5.62 h). Half-life values previously reported in lactating goats for moxifloxacin (2.17 h; Fernández-Varón et al., 2006b) and pefloxacin (2.75 h; Abd El-Aty and Goudah, 2002), were in the range of the values presented here. The same fact is observed with the half-lives after IM and SC administration of difloxacin and orbifloxacin: difloxacin half-life values are significantly longer ( $p < 0.05$ ) than those of orbifloxacin.

For difloxacin, the half-life after IM administration was significantly longer ( $p < 0.05$ ), than that after SC administration. Therefore, if the objective of the treatment is to obtain long persistence in milk, the IM administration will be the best alternative. However, half-life values after IM and SC administration of orbifloxacin were not significantly different ( $p < 0.05$ ), so milk permanency will be similar after both routes of administration.

Similar half-lives have been reported by several authors for various quinolones in lactating goats (pefloxacin:  $t_{1/2\lambda_z-IM} = 5.92$  h, Abd El-Aty and Goudah, 2002; moxifloxacin:  $t_{1/2\lambda_z-IM} = 3.82$  h, Cárceles et al., 2007;  $t_{1/2\lambda_z-SC} = 3.66$  h, Fernández-Varón et al., 2006b).

**Figure 06: Half-life values obtained in milk for different quinolones in other species** (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Escudero et al., 2007).



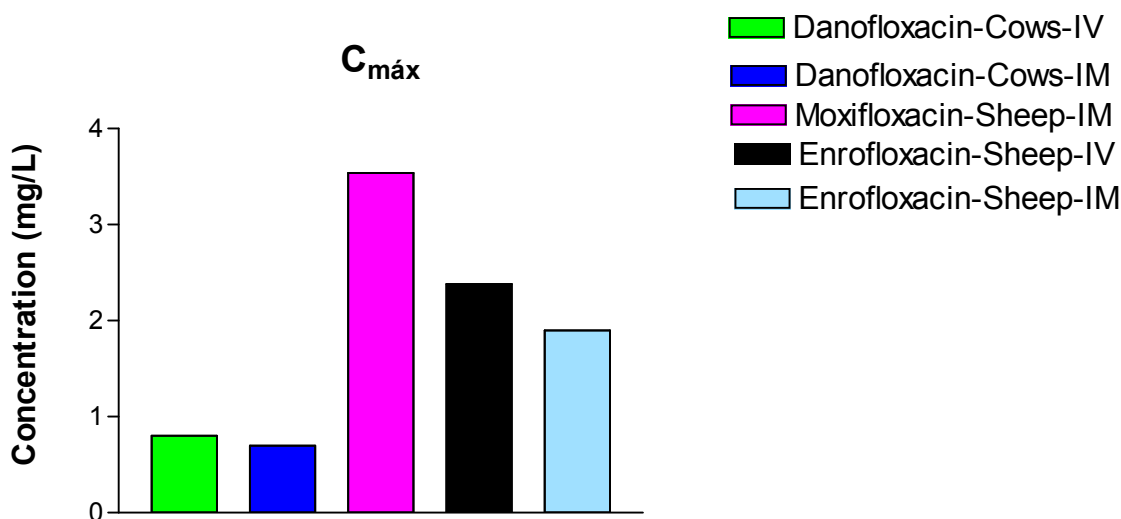
### 11.3.3. PEAK CONCENTRATION ( $C_{max}$ )

$C_{max}$  values in milk for ibafloxacin, difloxacin and orbifloxacin showed significant differences ( $p < 0.05$ ) for the same route of administration as doses were different too. However,  $C_{max}$  obtained for orbifloxacin after IV, IM and SC administration were not significantly different ( $p > 0.05$ ). For difloxacin, significant differences in  $C_{max}$  ( $p < 0.05$ ) were detected among IV administration and the extravascular routes, but not between IM and SC administration ( $p > 0.05$ ).

After these three routes of administration, the  $C_{max}$  of orbifloxacin were higher than those of difloxacin; therefore if it is required to reach a high concentration in milk, orbifloxacin will be the better option.

The  $C_{max}$  values of the fluoroquinolones obtained in the present study are higher than that reported for pefloxacin (Dose: 10 mg/kg;  $C_{max-IM} = 0.77$  mg/L, Abd El-Aty and Goudah, 2002) and lower than that of moxifloxacin (Dose: 5 mg/kg;  $C_{max-IM} = 3.94$  mg/L, Cárceles et al., 2007;  $C_{max-SC} = 3.22$  mg/L, Fernández-Varón et al., 2006b).

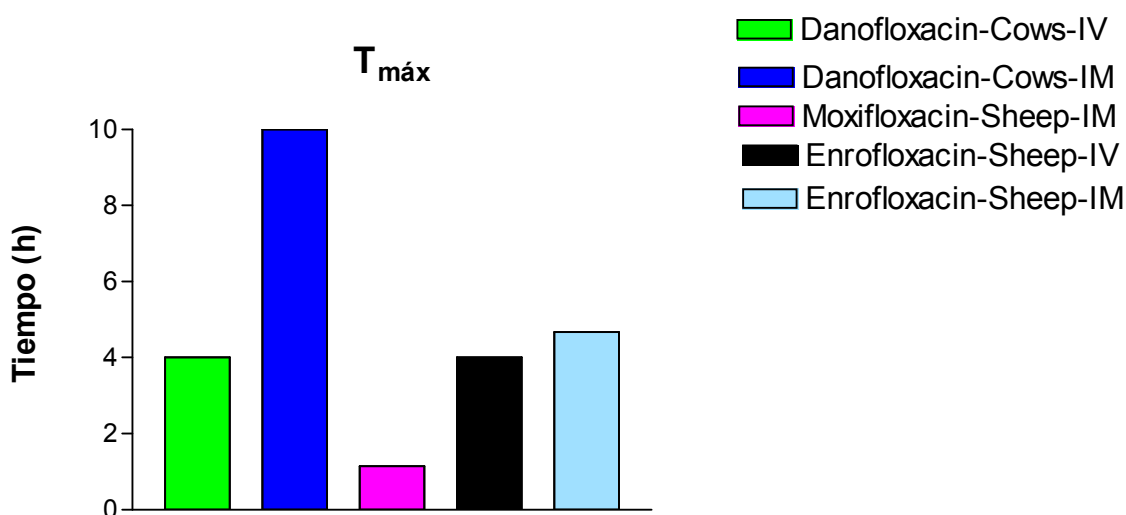
**Figure 07:  $C_{max}$  values reported in milk for different quinolones in other species** (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Haritova et al., 2003).



### 11.3.4. TIME TO REACH PEAK CONCENTRATION or $T_{\text{MÁX}}$

Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between  $t_{\text{max}}$  values after IV administration of ibafloxacin and orbifloxacin. After IM and SC administrations, difloxacin reached the latest  $C_{\text{max}}$ . Therefore if we want to obtain early high concentrations in milk, orbifloxacin will be more profitable than difloxacin, moreover orbifloxacin reach higher concentrations than difloxacin.  $T_{\text{max}}$  values, between 1.9 h and 3.67 h, have been reported for pefloxacin (Abd El-Aty and Goudah, 2002) and moxifloxacin (Cárceles et al., 2007; Fernández-Varón et al., 2006b).

**Figure 08:  $T_{\text{máx}}$  values reported in milk for different quinolones in other species** (Shem-Tov et al., 1998, Goudah, 2007, Haritova et al., 2003).



### 11.3.5. RATIO $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$

$AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$  and  $C_{\text{max-milk}}/C_{\text{max-plasma}}$  ratios are used to evaluate the penetration of drugs into milk.

After IV administration, the  $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$  ratios indicated good penetration for orbifloxacin from blood to milk (1.02), moderate for difloxacin (0.66) and poor for ibafloxacin (0.20). Significant differences were not found ( $p > 0.05$ ) between extravascular and intravenous administrations, for this parameter within each drug, therefore difloxacin and orbifloxacin showed the same penetration into milk after extravascular routes than after IV administration.  $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$  ratios obtained for moxifloxacin and pefloxacin

(Abd El-Aty and Goudah, 2002; Cárceles et al., 2007; Fernández-Varón et al., 2006b) were higher than those for difloxacin and orbifloxacin.

### 11.3.6. RATIO $C_{\text{max-milk}}/C_{\text{max-plasma}}$

After IM and SC administration, orbifloxacin showed higher concentrations and better penetration into milk than difloxacin. Significant differences were not found ( $p > 0.05$ ) between IM and SC administrations of orbifloxacin, however significant differences were found ( $p < 0.05$ ) between both extravascular administrations of difloxacin. So if we want to use difloxacin to treat a mammary gland infection, the SC route would be the better option.

Similar ratios have been reported by other authors for pefloxacin ( $C_{\text{max-milk}}/C_{\text{max-plasma}} = 0.9$ , Abd El-Aty and Goudah, 2002) and higher ratios for moxifloxacin after IM ( $C_{\text{max-milk}}/C_{\text{max-plasma}} = 1.68$ , Cárceles et al., 2007) and SC administrations ( $C_{\text{max-milk}}/C_{\text{max-plasma}} = 1.87$ , Fernández-Varón et al., 2006b).

## 11.4. PHARMACOKINETIC-PHARMACODYNAMIC INTEGRATION (PK/PD)

Thirty rabbit *S. aureus* strains were tested against danofloxacin and orbifloxacin. These strains were isolated from commercial rabbitries with chronic problems of staphylococcosis. *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 25922 strains were used as reference strains. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of danofloxacin and orbifloxacin are shown in the following tables:

**Table 15: MICs of danofloxacin against rabbit *Staphylococcus aureus* strains (n=30)**

Species	Origin	Number of strains with danofloxacin MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of													
		$\leq 0.03$	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
<i>S. aureus</i>	Rabbit				5	10	9	1	3				2		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Control						x								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control		x												

**Table 16: MICs of orbifloxacin against rabbit *Staphylococcus aureus* strains (n=30)**

Species	Origin	Number of strains with orbifloxacin MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of													
		$\leq 0.03$	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
<i>S. aureus</i>	Rabbit					17	7	3					3		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Control								x						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control		x												

Fluoroquinolones are a group of antibacterial drugs with an antimicrobial activity which is concentration-dependent; therefore they produce bacterial killing depending on the reached concentration. Consistently, high  $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$  and  $\text{C}_{\text{max}}/\text{MIC}$  ratios had been associated with a high efficacy and a lower incidence of resistance development in fluoroquinolones (Xuan et al., 2001; Andes and Craig, 2002). Previous investigations with animal models and different quinolones have shown that for fluoroquinolones, the ratios  $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}_{90} \geq 100-125$  or  $\text{C}_{\text{max}}/\text{CMI} \geq 8-10$  predict good clinical efficacy (Craig, 1998; Turnidge, 1999).

In the present study, the ratios  $\text{AUC}/\text{MIC}$  and  $\text{C}_{\text{max}}/\text{MIC}$  have been calculated in rabbits, after IM and SC administration of danofloxacin and orbifloxacin, for the strains tested here. These results are shown in the following tables:

**Table 17: Surrogate markers of efficacy calculated from pharmacokinetic parameters obtained after subcutaneous and intramuscular administration of danofloxacin at a single dose of 6 mg/kg bodyweight in rabbits (n=6).**

	Intramuscular	Subcutaneous
<b><math>\text{MIC}_{50} = 0.5 \text{ mg/L } S. aureus</math></b>		
$\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$	15.98 h	15.04 h
$\text{C}_{\text{max}}/\text{MIC}$	3.74	3.58
<b><math>\text{MIC}_{90} = 1 \text{ mg/L } S. aureus</math></b>		
$\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$	7.99 h	7.52 h
$\text{C}_{\text{max}}/\text{MIC}$	1.87	1.79

**Tabla 18: Surrogate markers of efficacy calculated from pharmacokinetic parameters obtained after subcutaneous and intramuscular administration of orbifloxacin at a single dose of 5 mg/kg bodyweight in rabbits (n=6).**

	Intramuscular	Subcutaneous
<b>MIC= 0.5 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	13.5 h	14 h
C <sub>max</sub> /MIC	6.48	5.9
<b>MIC= 1 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	6.75 h	7 h
C <sub>max</sub> /MIC	3.24	2.95
<b>MIC= 2 mg/L <i>S. aureus</i></b>		
AUC <sub>24</sub> /MIC	3.38 h	3.5 h
C <sub>max</sub> /MIC	1.62	1.48

These ratios suggested low effectiveness of danofloxacin and orbifloxacin against *S. aureus* infections in rabbits caused by the strains tested in the present study.

However, it is necessary to note that the numerical values of C<sub>max</sub>/MIC<sub>90</sub> and AUC<sub>24</sub>/MIC<sub>90</sub>, used as surrogate markers to predict optimal dosage, have been generated in experimental infections in laboratory animals or in human clinical trials, and that these numerical values may or may not be applicable to rabbit infections or in general to animal infections (Lees and Shojaee Aliabadi, 2002; Toutain and Lees, 2004).

Moreover, the composition of the growth media differs in several aspects from body fluids such as plasma and interstitial fluid, for example in terms of electrolyte concentrations such as calcium and magnesium (which can bind and inactivate some antimicrobial drugs), pH (many drugs are weak acids or bases and there is a pH dependency to their antimicrobial activity) and protein concentration (only free, that is unbound drug, is microbiologically active and the drug bound to plasma, interstitial fluid or tissue proteins *in vivo* will limit the concentration of free drug). Consequently, it can not be assumed that MIC values determined in artificial media will be identical to those in natural body fluids (Shojaee Aliabadi and Lees, 2003).

In fact, Lees and Shojaee Aliabadi (2002) have studied in *ex vivo* experiments the ratio of AUC/MIC producing bacteriostasis, bactericidal activity and elimination of bacteria with different fluoroquinolones. In all these cases, the surrogate markers for cattle, sheep, goat and camel were lower than 100-125:

<b>AUC/MIC</b>	<b>Cattle</b>	<b>Sheep</b>	<b>Goats</b>	<b>Camel</b>
<b>Bacteriostatic</b>	15,9 ± 2	17,8 ± 1,7	22,6 ± 1,7	17,2 ± 3,6
<b>Bactericidal</b>	18,1 ± 1,9	20,2 ± 1,7	29,6 ± 2,5	21,2 ± 3,7
<b>Erradication</b>	33,5 ± 3,5	28,7 ± 1,8	52,4 ± 8,1	68,7 ± 15,6

## **12.- CONCLUSIONES**



1. El método descrito para la determinación de ibafloxacino en plasma de conejo mostró una respuesta lineal en los rangos de concentración de 10-100 y 100-2000  $\mu\text{g/L}$  en las curvas de calibrado empleadas en el estudio. El límite de cuantificación (LOQ) es 10  $\mu\text{g/L}$  y el límite de detección 5  $\mu\text{g/L}$ . El valor medio de recuperación de ibafloxacino es 96.08 % y la repetitibilidad intra-día y entre-día a las concentraciones estudiadas, mostraron un RSD, en todos los casos, menor al 8%.

2. El comportamiento del difloxacino tras su administración IV en la oveja, a una dosis única de 5 mg/kg, se ajusta a un modelo bicompartimental. Las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) obtenidas para este antibiótico son similares tras las administraciones IV (11.43 h), IM (13.89 h) y SC (12.02 h). La depuración de difloxacino en la oveja, medida por el aclaramiento plasmático (Cl), adquiere un valor de  $0,21 \pm 0,03$  L/kg·h. El valor del volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss} = 1,68 \pm 0,21$  L/kg) del difloxacino indica que existe una buena distribución del fármaco y un buen acceso a los tejidos en esta especie.

3. La biodisponibilidad (F) del difloxacino, tras su administración SC en la oveja es elevada, con un valor del  $82.35 \pm 25.65$  %. Algo mayor resulta la biodisponibilidad de este antibiótico cuando se administra por vía IM ( $99.92 \pm 26.50$  %), existiendo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre estos valores de biodisponibilidad. La concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) obtenida por vía IM ( $1.89 \pm 0.55$  mg/L) es ligeramente superior a la obtenida por vía SC ( $1.39 \pm 0.14$  mg/L), no existiendo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambas. Sí existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para el tiempo en que se alcanza dicha concentración máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ) entre la vía SC ( $5.33 \pm 1.03$  h) y la vía IM ( $2.42 \pm 1.28$  h). Por tanto, resultaría ventajoso iniciar un tratamiento con una administración IM para alcanzar rápidamente una concentración plasmática elevada y continuar con administraciones subcutáneas que alargasen en el tiempo dichas concentraciones.

4. El comportamiento del difloxacino tras su administración IV y el de danofloxacino tras su administración IV e IG en el caballo, a una dosis única de 5 y 1.25 mg/kg, respectivamente, se ajusta a un modelo bicompartimental. Mientras que tras las administraciones IM de difloxacino y danofloxacino e IG de difloxacino, a igual dosis, se ajustan mejor a un modelo monocompartimental. Las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) obtenidas para danofloxacino fueron similares tras las administraciones IV (6.31 h), IM (5.36 h) e IG (4.74 h). Sin embargo, las semividas para difloxacino fueron significativamente ( $P < 0,05$ )

diferentes tras las administraciones IV (2.66 h), IM (5.72 h) e IG (10.75 h). El aclaramiento plasmático (Cl) adquirió un valor similar para ambos fármacos ( $Cl_{\text{difloxacino}} = 0,28 \pm 0,03$  L/kg·h y  $Cl_{\text{danofloxacino}} = 0,34 \pm 0,01$  L/kg·h), mientras que el volumen de distribución en estado estacionario del difloxacino ( $V_{ss} = 1,02 \pm 0,09$  L/kg) fue la mitad del obtenido para danofloxacino ( $V_{ss} = 2.00 \pm 0,30$  L/kg). En ambos casos, la distribución es amplia y confirma, en principio, el acceso de los antibióticos a los lugares de infección.

5. La biodisponibilidad (F) del difloxacino y danofloxacino, tras su administración IM en caballo, es elevada ( $F_{\text{difloxacino}} = 95.81 \pm 3.11$  % y  $F_{\text{danofloxacino}} = 88.48 \pm 11.10$  %). Algo menor resulta la biodisponibilidad de difloxacino cuando se administra por vía IG ( $68.62 \pm 10.60$  %), y escasa la de danofloxacino tras su administración por esta misma vía ( $22.36 \pm 6.84$  %). Las concentraciones máximas ( $C_{\text{máx}}$ ) obtenidas por vía IM e IG ( $1.48 \pm 0.12$  y  $0.73 \pm 0.05$  mg/L, respectivamente) para difloxacino, fueron muy superiores a las obtenidas para danofloxacino por las mismas vías de administración ( $0.35 \pm 0.05$  y  $0.21 \pm 0.07$  mg/L, respectivamente) (teniendo en cuenta que  $C_{\text{máx}}$  es un parámetro dosis-dependiente). Igualmente, el tiempo en que se alcanzaron dichas concentraciones fue mayor para difloxacino ( $t_{\text{máx-IM}} = 2.76 \pm 0.70$  h y  $t_{\text{máx-IG}} = 2.34 \pm 0.60$  h) que para danofloxacino ( $t_{\text{máx-IM}} = 1.42 \pm 0.59$  h y  $t_{\text{máx-IG}} = 0.53 \pm 0.32$  h). A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta las diferencias de dosis, difloxacino es preferible en caballo, desde un punto de vista farmacocinético, a danofloxacino.

6. El comportamiento del ibafloxacino tras su administración IV, y el de difloxacino y orbifloxacino tras su administración IV, IM y SC en cabra, a dosis única de 15, 5 y 5 mg/kg, respectivamente, se ajusta a un modelo bicompartimental. Las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) obtenidas para difloxacino tras las administraciones IV (4.92 h), IM (10.44 h) y SC (7.33 h) fueron mayores que las obtenidas para orbifloxacino por las mismas vías ( $t_{1/2\lambda z} = 4.12, 3.34$  y  $4.99$  h, respectivamente), e ibafloxacino tras su administración IV (3.76 h). La depuración plasmática del ibafloxacino ( $Cl = 1.05 \pm 0.10$  L/kg·h) fue más rápida que la del difloxacino ( $Cl = 0.32 \pm 0.05$  L/kg·h) y orbifloxacino ( $Cl = 0.40 \pm 0.11$  L/kg·h), mientras que el volumen de distribución en estado estacionario del ibafloxacino ( $V_{ss} = 1,65 \pm 0,42$  L/kg) fue ligeramente superior al obtenido para difloxacino ( $V_{ss} = 1.16 \pm 0,26$  L/kg) y orbifloxacino ( $V_{ss} = 1.13 \pm 0,08$  L/kg).

7. Las biodisponibilidades (F) del difloxacino ( $F_{\text{IM}} = 106.79 \pm 13.95$  % y  $F_{\text{SC}} = 90.16 \pm 11.99$  %) y orbifloxacino ( $F_{\text{IM}} = 105.01 \pm 15.61$  % y  $F_{\text{SC}} = 108.96 \pm 17.61$  %) en cabra fueron elevadas. Las concentraciones máximas ( $C_{\text{máx}}$ ) obtenidas por vía IM y SC

para difloxacino ( $1.97 \pm 0.40$  y  $1.33 \pm 0.25$  mg/L, respectivamente), fueron similares a las obtenidas para orbifloxacino ( $1.66 \pm 0.14$  y  $1.85 \pm 0.20$  mg/L, respectivamente) (teniendo en cuenta que  $C_{\text{máx}}$  es un parámetro dosis-dependiente). Estas concentraciones máximas se alcanzaron posteriormente en el caso del difloxacino ( $t_{\text{máx-IM}} = 1.79 \pm 1.14$  h y  $t_{\text{máx-SC}} = 3.37 \pm 0.36$  h) que en el del orbifloxacino ( $t_{\text{máx-IM}} = 0.87 \pm 0.38$  h y  $t_{\text{máx-SC}} = 1.25 \pm 0.22$  h).

8. En la cabra, las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) en leche obtenidas tras la administración IV de ibafloxacino (2.37 h) y orbifloxacino (1.84 h), y tras la administración IM (1.94 h) y SC (1.93 h) de este último, fueron menores que las obtenidas para difloxacino ( $t_{1/2\lambda z-IV} = 5.62$  h,  $t_{1/2\lambda z-IM} = 6.38$  h,  $t_{1/2\lambda z-SC} = 4.50$  h). Sin embargo, tras las vías IM y SC, son mayores las  $C_{\text{max}}$  obtenidas para el orbifloxacino (1.77 y 1.73 mg/kg, respectivamente) que las del difloxacino (1.28 y 1.20, respectivamente) (teniendo en cuenta que  $C_{\text{máx}}$  es un parámetro dosis-dependiente), por lo que de buscar una concentración más elevada, esta fluoroquinolona resulta ligeramente más ventajosa que el difloxacino. Además, para orbifloxacino las ratios  $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$  y  $C_{\text{max-leche}}/C_{\text{max-plasma}}$  tras las administraciones IM (1.21 y 1.05, respectivamente) y SC (1.15 y 0.95, respectivamente) indican una mayor penetración en leche que el difloxacino (IM: 0.65 y 0.67; SC: 0.68 y 0.90, respectivamente). Por tanto, orbifloxacino es preferible a difloxacino por su mejor penetración en leche y presumiblemente, por que precisará periodos de suspensión más cortos.

9. El comportamiento del danofloxacino tras su administración IV y el de orbifloxacino tras su administración IV, IM y SC en el conejo, a una dosis única de 6 y 5 mg/kg, respectivamente, se ajusta a un modelo bicompartimental. Mientras que tras la administración de danofloxacino (IM y SC), a igual dosis, se ajusta mejor a un modelo monocompartimental. Las semividas ( $t_{1/2\lambda z}$ ) obtenidos para danofloxacino tras las administraciones IV (4.88 h), IM (6.70 h) y SC (8.20 h) fueron mayores que las obtenidas para orbifloxacino (IV: 2.50 h, IM: 2.54 h, SC: 5.14 h), ibafloxacino (IV: 2.85 h) y moxifloxacino (IV: 2.15 h, SC: 5.41 h). Solamente fue mayor la semivida obtenida para moxifloxacino tras la administración SC en formulación de liberación sostenida (11.09 h). El aclaramiento plasmático (Cl) adquirió un valor similar para danofloxacino ( $0.76 \pm 0.10$  L/kg·h), orbifloxacino ( $0.91 \pm 0.20$  L/kg·h) y moxifloxacino ( $0.78 \pm 0.16$  L/kg·h), y fue muy superior en el caso del ibafloxacino ( $5.83 \pm 0.40$  L/kg·h). Los volúmenes de distribución en estado estacionario, en orden decreciente, adquirieron un valor de  $5.09 \pm 0.49$ ,  $3.16 \pm 0.83$ ,  $2.08 \pm 0.19$  y  $1.71 \pm 0.38$  L/kg para ibafloxacino, danofloxacino,

moxifloxacino y orbifloxacino, respectivamente. Estos valores muestran una buena e incluso excelente penetración en tejidos, lo que posibilita el tratamiento de infecciones, causadas por gérmenes sensibles, con localizaciones variadas.

10. Las biodisponibilidades (F) del danofloxacino ( $F_{IM} = 102.34 \pm 5.17 \%$  y  $F_{SC} = 96.44 \pm 5.95 \%$ ), orbifloxacino ( $F_{IM} = 109.87 \pm 8.36 \%$  y  $F_{SC} = 110.67 \pm 11.02 \%$ ) y moxifloxacino ( $F_{SC} = 117 \pm 17 \%$ ) en conejo fueron elevadas, a excepción, de la del moxifloxacino en formulación de liberación sostenida ( $F_{SC} = 44 \pm 16 \%$ ). Las concentraciones máximas ( $C_{m\acute{a}x}$ ) obtenidas por vía IM y SC para danofloxacino ( $1.87 \pm 0.18$  y  $1.79 \pm 0.14$  mg/L, respectivamente), fueron similares a las obtenidas para moxifloxacino ( $C_{m\acute{a}x-SC} = 1.61 \pm 0.49$  mg/L y  $C_{m\acute{a}x-SC-P407} = 1.83 \pm 0.62$  mg/L), pero inferiores a las del orbifloxacino ( $C_{m\acute{a}x-IM} = 3.24 \pm 1.33$  mg/L y  $C_{m\acute{a}x-SC} = 2.95 \pm 0.82$  mg/L) (teniendo en cuenta que  $C_{m\acute{a}x}$  es un parámetro dosis-dependiente). Estas concentraciones máximas se alcanzaron al mismo tiempo, prácticamente, en el caso de danofloxacino ( $t_{m\acute{a}x-IM} = 0.67 \pm 0.08$  h y  $t_{m\acute{a}x-SC} = 0.68 \pm 0.24$  h), orbifloxacino ( $t_{m\acute{a}x-IM} = 0.67 \pm 0.20$  h y  $t_{m\acute{a}x-SC} = 0.65 \pm 0.12$  h) y moxifloxacino ( $t_{m\acute{a}x-SC} = 0.83$  h), y muy posteriormente cuando empleamos la formulación de liberación sostenida con moxifloxacino ( $t_{m\acute{a}x-SC-P407} = 4.95$  h).

11. Con datos de CMI de danofloxacino y orbifloxacino, determinados *in vitro* frente a cepas específicas de *Staphylococcus aureus* y teniendo en cuenta los índices  $C_{m\acute{a}x}/CMI > 8$  y  $AUC/CMI > 100$ , se puede concluir que a una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino o 5 mg/kg de orbifloxacino, estas quinolonas no parecen ser efectivas contra las cepas de *Staphylococcus aureus* testadas en nuestro estudio.

## **13.- CONCLUSIONS**

1. The analytical method for ibafloxacin determination in rabbit plasma showed a linear response over the concentration range of 10-100 and 100-2000  $\mu\text{g/L}$  for both calibration curves used in this assay. The limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) were 10  $\mu\text{g/L}$  and 5  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Mean absolute recovery of ibafloxacin was 96.08 %. Intra-day repeatability and inter-day reproducibility at the studied concentrations showed a RSD less than 8 % in each concentration.

2. Plasma concentrations of difloxacin after IV administration, at a single dose of 5 mg/kg, were best described by a two-compartment model in sheep. The half-lives ( $t_{1/2\lambda z}$ ) were similar after IV (11.43 h), IM (13.89 h) and SC (12.02 h) administration. Clearance and apparent volume of distribution at steady-state were  $0.21 \pm 0.03$  L/kg·h and  $1.68 \pm 0.21$  L/kg, respectively.

3. In sheep, the bioavailabilities (F) of difloxacin after SC and IM administration were high ( $82.35 \pm 25.65$  % and  $99.92 \pm 26.50$  %, respectively) and differed significantly ( $P < 0.05$ ).  $C_{\text{max}}$  after IM administration ( $1.89 \pm 0.55$  mg/L) was higher than that after SC administration ( $1.39 \pm 0.14$  mg/L), but significant differences ( $P > 0.05$ ) were not found. However, significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between the times to reach maximum plasma concentration ( $t_{\text{max}}$ ) after SC ( $5.33 \pm 1.03$  h) and IM ( $2.42$  h  $\pm$  1.28) administration. Therefore a treatment could start with an IM administration to reach quickly high plasma concentrations, and continue with a SC administration to extend these concentrations along the time.

4. Difloxacin and danofloxacin concentrations after IV and IG (only danofloxacin) administration, at single doses of 5 and 1.25 mg/kg, respectively, were best described by a two-compartment model in horses. Difloxacin and danofloxacin concentrations after IM and IG (only difloxacin) administration, at the same above doses, were best described by a one-compartment model. The half-lives ( $t_{1/2\lambda z}$ ) for danofloxacin after IV (6.31 h), IM (5.36 h) and IG (4.74 h) administration were similar. However significant differences ( $P < 0.05$ ) were found among the half-lives ( $t_{1/2\lambda z}$ ) of difloxacin after IV (2.66 h), IM (5.72 h) and IG (10.75 h) administration. Clearance values (Cl) were similar for both drugs ( $Cl_{\text{difloxacin}} = 0.28 \pm 0.03$  and  $Cl_{\text{danofloxacin}} = 0.34 \pm 0.01$  L/kg·h), while apparent volume of distribution at steady state for difloxacin ( $V_{\text{ss}} = 1.02 \pm 0.09$  L/kg) was lower than that of danofloxacin ( $V_{\text{ss}} = 2.00 \pm 0.30$  L/kg). Nevertheless, both quinolones had a wide distribution in horses.

5. Bioavailabilities (F) of difloxacin and danofloxacin after IM administration were high in horses ( $F_{\text{difloxacin}} = 95.81 \pm 3.11 \%$  and  $F_{\text{danofloxacin}} = 88.48 \pm 11.10 \%$ ). After IG administration, bioavailability was low for difloxacin ( $68.62 \pm 10.60 \%$ ) and very poor for danofloxacin ( $22.36 \pm 6.84 \%$ ). The obtained  $C_{\text{max}}$  after IM and IG administrations ( $1.48 \pm 0.12$  and  $0.73 \pm 0.05$  mg/L, respectively) for difloxacin, were much higher than those of danofloxacin after the same routes ( $0.35 \pm 0.05$  and  $0.21 \pm 0.07$  mg/L, respectively) (having into account that  $C_{\text{max}}$  is a concentration-dependent parameter). Equally, the times to reach peak concentration ( $t_{\text{max}}$ ) for difloxacin ( $t_{\text{max-IM}} = 2.76 \pm 0.70$  h and  $t_{\text{max-IG}} = 2.34 \pm 0.60$  h) were longer than those of danofloxacin ( $t_{\text{max-IM}} = 1.42 \pm 0.59$  h and  $t_{\text{max-IG}} = 0.53 \pm 0.32$  h). With these results at different doses, difloxacin is a better option than danofloxacin in horses (from a pharmacokinetic point of view)

6. Ibafoxacin concentrations after IV administration, and difloxacin and orbifloxacin concentrations after IV, IM and SC administration, at single doses of 15, 5 and 5 mg/kg, respectively, were best described by a two-compartment model in goats. The half-lives ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) for difloxacin after IV (4.92 h), IM (10.44 h) and SC (7.33 h) administration were higher than those of orbifloxacin ( $t_{1/2\lambda_z} = 4.12, 3.34$  y  $4.99$  h, respectively) and ibafloxacin (3.76 h). Plasma clearance (Cl) for ibafloxacin ( $Cl = 1.05 \pm 0.10$  L/kg·h) was faster than those for difloxacin ( $Cl = 0.32 \pm 0.05$  L/kg·h) and orbifloxacin ( $Cl = 0.40 \pm 0.11$  L/kg·h), while the apparent volume of distribution at steady state of ibafloxacin ( $V_{ss} = 1,65 \pm 0,42$  L/kg) was slightly higher than those of difloxacin ( $V_{ss} = 1.16 \pm 0,26$  L/kg) and orbifloxacin ( $V_{ss} = 1.13 \pm 0,08$  L/kg).

7. Bioavailabilities (F) of difloxacin ( $F_{\text{IM}} = 106.79 \pm 13.95 \%$  and  $F_{\text{SC}} = 90.16 \pm 11.99 \%$ ) and orbifloxacin ( $F_{\text{IM}} = 105.01 \pm 15.61 \%$  and  $F_{\text{SC}} = 108.96 \pm 17.61 \%$ ) were high in goats. The  $C_{\text{max}}$  after IM and SC administration ( $1.97 \pm 0.40$  y  $1.33 \pm 0.25$  mg/L, respectively) for difloxacin, were similar to those of orbifloxacin ( $1.66 \pm 0.14$  and  $1.85 \pm 0.20$  mg/L, respectively) (having into account that  $C_{\text{max}}$  is a concentration-dependent parameter). For difloxacin these peak concentrations were reached later ( $t_{\text{max-IM}} = 1.79 \pm 1.14$  h and  $t_{\text{max-SC}} = 3.37 \pm 0.36$  h) than those of orbifloxacin ( $t_{\text{max-IM}} = 0.87 \pm 0.38$  h and  $t_{\text{max-SC}} = 1.25 \pm 0.22$  h).

8. In goats, half-lives ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) obtained in milk after IV administration of ibafloxacin (2.37 h), and after IV (1.84 h), IM (1.94 h) and SC (1.93 h) administration of orbifloxacin were shorter than those of difloxacin ( $t_{1/2\lambda_z\text{-IV}} = 5.62$  h,  $t_{1/2\lambda_z\text{-IM}} = 6.38$  h,  $t_{1/2\lambda_z\text{-SC}} = 4.50$  h). However,  $C_{\text{max}}$  values after IM and SC administration of orbifloxacin (1.77 y 1.73

mg/kg, respectively) were higher than those of difloxacin (1.28 y 1.20, respectively) (having into account that  $C_{\max}$  is a concentration-dependent parameter), therefore if we want to reach high concentrations, orbifloxacin will be better than difloxacin. Moreover, the surrogate markers  $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}}$  and  $C_{\max\text{-milk}}/C_{\max\text{-plasma}}$  obtained for orbifloxacin after IM (1.21 and 1.05, respectively) and SC (1.15 and 0.95, respectively) administration indicated a better penetration into milk than difloxacin (IM: 0.65 and 0.67, respectively; SC: 0.68 and 0.90, respectively). Then orbifloxacin is more profitable than difloxacin for its better penetration in milk and short withdrawal period.

9. Danofloxacin concentrations after IV administration, and orbifloxacin concentrations after IV, IM and SC administration, at single doses of 6 and 5 mg/kg, respectively, were best described by a two-compartment model in rabbits. Danofloxacin concentrations after IM and SC administration, at the same above-mentioned dose, were best described by a one-compartment model. Half-lives ( $t_{1/2\lambda_z}$ ) of danofloxacin after IV (4.88 h), IM (6.70 h) and SC (8.20 h) administration were longer than those of orbifloxacin (IV: 2.50 h, IM: 2.54 h, SC: 5.14 h), ibafloxacin (IV: 2.85 h) and moxifloxacin (IV: 2.15 h, SC: 5.41 h). Only the half-life of the long-acting formulation of moxifloxacin administered subcutaneously (11.09 h) was longer than those of danofloxacin. Clearance values (Cl) were similar for danofloxacin ( $0.76 \pm 0.10$  L/kg·h), orbifloxacin ( $0.91 \pm 0.20$  L/kg·h) and moxifloxacin ( $0.78 \pm 0.16$  L/kg·h), except to that of ibafloxacin ( $5.83 \pm 0.40$  L/kg·h). Apparent volumes of distribution at steady state were  $5.09 \pm 0.49$ ,  $3.16 \pm 0.83$ ,  $2.08 \pm 0.19$  and  $1.71 \pm 0.38$  L/kg, for ibafloxacin, danofloxacin, moxifloxacin and orbifloxacin, respectively. These values suggest good penetration in tissues.

10. Bioavailabilities (F) of danofloxacin ( $F_{\text{IM}} = 102.34 \pm 5.17$  % and  $F_{\text{SC}} = 96.44 \pm 5.95$  %), orbifloxacin ( $F_{\text{IM}} = 109.87 \pm 8.36$  % and  $F_{\text{SC}} = 110.67 \pm 11.02$  %) and moxifloxacin ( $F_{\text{SC}} = 117 \pm 17$  %) were high, except that corresponding to the SC long-acting formulation of moxifloxacin ( $F_{\text{SC}} = 44 \pm 16$  %). Maximum concentrations ( $C_{\max}$ ) after IM and SC administration of danofloxacin ( $1.87 \pm 0.18$  and  $1.79 \pm 0.14$  mg/L, respectively), were similar to those of moxifloxacin ( $C_{\max\text{-SC}} = 1.61 \pm 0.49$  mg/L and  $C_{\max\text{-SC-P407}} = 1.83 \pm 0.62$  mg/L), but lower than those of orbifloxacin ( $C_{\max\text{-IM}} = 3.24 \pm 1.33$  mg/L and  $C_{\max\text{-SC}} = 2.95 \pm 0.82$  mg/L) (having into account that  $C_{\max}$  is a concentration-dependent parameter). These maximum concentrations were reached at similar time for danofloxacin ( $t_{\max\text{-IM}} = 0.67 \pm 0.08$  h and  $t_{\max\text{-SC}} = 0.68 \pm 0.24$  h), orbifloxacin ( $t_{\max\text{-IM}} =$



$0.67 \pm 0.20$  h and  $t_{\max\text{-SC}} = 0.65 \pm 0.12$  h) and moxifloxacin ( $t_{\max\text{-SC}} = 0.83$  h), except the long acting formulation of moxifloxacin ( $t_{\max\text{-SC-P407}} = 4.95$  h).

11. According to MIC data obtained against *Staphylococcus aureus* strains tested for danofloxacin and orbifloxacin, and using the  $C_{\max}/\text{CMI} > 8$  and  $\text{AUC}/\text{CMI} > 100$  surrogate markers, a single dose of danofloxacin (6 mg/kg) or orbifloxacin (5 mg/kg), do not seem to be effective in rabbits infected with the *S. aureus* strains assayed here.

## **14.- BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES**

Abd El-Aty, A.M. and A. Goudah, Some pharmacokinetic parameters of pefloxacin in lactating goats, *Veterinary research communications* 26 (2002), pp. 553-61.

Abo El-Sooud, K.A., Influence of albendazole on the disposition kinetics and milk antimicrobial equivalent activity of enrofloxacin in lactating goats, *Pharmacological Research* 48 (2003), pp. 389-395.

Alekshun, M.N. and S.B. Levy, The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals, *Trends in Microbiology* 7 (1999), pp. 410–413.

AliAbadi, F.S. and P. Lees, Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate, *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 25 (2002), pp. 161–174.

AliAbadi, F.S. and P. Lees, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration, *American journal of veterinary research* 62 (12) (2001), pp. 1979-89.

Aminimanizani, A., P. Beringer and R. Jelliffe, Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials, *Clinical Pharmacokinetics* 40 (2001), pp. 169–187.

Andes, D. and W.A. Craig, Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (2002), pp. 1665–1670.

Appelbaum, P.C. and P.A. Hunter, P.A., The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16(1) (2000), pp. 5-15.

Araki, H., N. Ogake, S. Minami, Y. Watanabe, H. Narita, I. Tamai and A. Tsuji, Application of muscle microdialysis to evaluate the concentrations of the fluoroquinolones pazufloxacin and ofloxacin in the tissue interstitial fluids of rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49 (1997), pp. 1141–1144.

Atkinson, A.J. Jr and W. Kushner, Clinical pharmacokinetics, *Annual review of pharmacology and toxicology* 19 (1979), pp. 105-27.

Ball, P., Quinolone generations: natural history or natural selection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (2000) (Suppl T1), pp. 17–24.

Baruah, H, D.C. Roy, R.K. Roy and H.N. Khonokor, Pharmacokinetics, tissue residue and plasma protein binding of ofloxacin in goats, *Journal of Veterinary Science* 5 (2) (2004), pp. 97-101.

Bebear, C.M., H. Renaudin, A. Charron, M. Clerc, S. Pereyre and C. Bebear, DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (2003), pp. 3323–3325.

Bergogne-Berezin, E., Clinical role of protein binding of quinolones, *Clinical Pharmacokinetics* **41** (2002), pp. 741–750.

Bertino Jr., J. and D. Fish, The safety profile of the fluoroquinolones, *Clinical Therapeutics* **22** (2000), pp. 798–817.

Bousquet-Melou, A., S. Bernard, M. Schneider and P.L. Toutain, Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses, *Equine Veterinary Journal* **34**(4) (2002), pp. 366-72.

Brown, S.A., Fluoroquinolones in animal health, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19** (1996), 1-14.

Butts, J.D., Intracellular concentrations of antibacterial agents and related clinical implications, *Clinical Pharmacokinetics* **27** (1994), pp. 63–84.

Cárceles, C.M., L. Villamayor, E. Escudero, P. Marín and E. Fernández-Varón, Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intramuscular administration to lactating goats, *The Veterinary Journal* **173** (2007), pp. 452-455.

Carretero, M., C. Rodriguez, M.I. San Andres, P. Fores, J.J. de Lucas, J. Nieto, M.D. San Andres and F. Gonzalez, Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration, *Equine Veterinary Journal* **34** (2002), pp. 360–365.

Chiba, K., A. Sugiyama, T. Hagiwara, S. Takahashi, K. Takasuna and K. Hashimoto, In vivo experimental approach for the risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents-induced long QT syndrome. *European Journal of Pharmacology* **486** (2004), pp. 189-200.

Costerton, J.W., P.S. Stewart and E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* **284** (1999), pp. 1318–1322.

Coulet, M., C. Morello, P. Cox and J. Lohuis, Pharmacokinetics of ibafloxacin in healthy cats, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **28** (2005), pp. 37–44.

Coulet, M., M. Van Borssum Waalkes, O.R. Leeuwenkamp, P. Cox and J. Lohuis, Pharmacokinetics of ibafloxacin following intravenous, oral administration to healthy Beagle dogs, *Journal of Veterinary Pharmacological and Therapeutics* **25** (2002), pp.89-

97.

Cox, S.K., M.B. Cottrell, L. Smith, M.G. Papich, D.L. Frazier and J. Bartges, Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species, *Journal of Veterinary Pharmacological and Therapeutics* **27** (2004), pp. 139–146.

Craig, W.A., Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men, *Clinical Infectious Diseases* **26** (1998), pp. 1–10.

Craig, W.A. and A. Dalhoff, Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. In: G.V.R. Born, P. Cuatrecas, D. Ganten, H. Herken, K.L. Melmon and K. Starke, Editors, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin (1998), pp. 208–232.

Craig, W.A. and S.C. Ebert, Protein binding and its significance in antibacterial therapy, *Infectious Disease Clinics of North America* **3** (1989), pp. 407–414.

Cubeddu, L.X., QT prolongation and fatal arrhythmias: a review of clinical implications and effects of drugs, *American Journal Therapeutics* **10** (2003), pp. 452–457.

Curtis, L.H., T. Ostbye, V. Sendersky, S. Hutchison, N.M. Allen LaPointe, S.M. Al Khatib, Y.S. Usdin, P.E. Dans, A. Wright, R.M. Califf, R.L. Woosley and K.A. Schulman, Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients, *American Journal of Medicine* **114** (2003), pp. 135–141.

Dautrey, S., K. Felice, A. Petiet, B. Lacour, C. Carbon and R. Farinotti, Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates, *British Journal of Pharmacology* **127** (1999), pp. 1728–1734.

Davis, J.L., M.G. Papich and A. Weingarten, The pharmacokinetics of orbifloxacin in the horse following oral and intravenous administration, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29** (2006), pp. 191–197.

Deziel, M.R., Louis, A., Heine, H., Bush, K., Kao, M., Kelley, M., Drusano, G.L., 2001. Evaluation of levofloxacin in a hollow fiber infection model against *Bacillus anthracis* utilizing both human and Rhesus Monkey pharmacokinetic profiles. Abstracts of the 41st Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract # A-1157, Chicago, IL.

Ding, H.Z., Z.L. Zeng, K.F. Fung, Z.L. Chen and G.L. Qiao, Pharmacokinetics of sarafloxacin in pigs and broilers following intravenous, intramuscular, and oral single-dose

applications, , *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **24** (2001), pp. 303-308.

Drusano, G.L. 2002. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. In: Proceedings of the 10th ISAP Symposium: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics (PK/PD): Towards Definitive Criteria. Milan, Italy, April 27–28.

Drusano, G.L., D.E. Johnson, M. Rosen and H.C. Standiford, Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37** (1993), pp. 483–490.

El-Banna, H.A. and K. Abo El-Sooud, Disposition kinetics of ciprofloxacin in lactating goats, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **105** (1998), pp. 35-38.

Escudero, E., C.M. Cárceles, E. Fernández-Varón, P. Marín and H. Benchaoui, Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **30(6)** (2007), pp. 572-7.

Escudero, E., A. Espuny, S. Vicente and C.M. Cárceles, Pharmacokinetics of an ampicillin-sulbactam combination after intravenous and intramuscular administration to sheep, *Canadian Journal of Veterinary Research* **63(1)** (1999), pp. 25-30.

Everett, M.J., Y.F. Jin, V. Ricci and L.J. Piddock, Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (1996), pp. 2380–2386.

Fang, W. and S. Pyörälä, Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk, *Journal of Dairy Science* **79(1)** (2006), pp. 76-82.

Federal Register. 63 Fed. Reg. 8122 (Feb 18 1998). 1998.

Fernández-Varón, E., P. Marín, E. Escudero, D. Vancraeynest and C.M. Cárceles, Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **30** (2007), pp. 18-24.

Fernández-Varón, E., I. Ayala, P. Marín, A. Carrión, N. Martos, E. Escudero and C.M. Cárceles, Pharmacokinetics of danofloxacin in horses after intravenous, intramuscular and intragastric administration, *Equine Veterinary Journal* **38(4)** (2006a), pp. 342-6.

Fernández-Varón, E., L. Villamayor, E. Escudero, A. Espuny, and C.M. Cárceles, Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intravenous and subcutaneous administration to lactating goats, *The Veterinary Journal* 172 (2006b), pp. 302-7.

Fernández-Varón, E., M.J. Bovaira, A. Espuny, E. Escudero, D. Vancraeynest, and C.M. Cárceles, Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of moxifloxacin in rabbits after intravenous, intramuscular and oral administration, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28 (2005), pp. 343-348.

Forrest, A., S. Chodosh, M.A. Amantea, D.A. Collins and J.J. Schentag, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (1997) (Suppl A), pp. 45–57.

Forrest, A., D.E. Nix, C.H. Ballow, T.F. Goss, M.C. Birmingham and J.J. Schentag, Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (1993), pp. 1073–1081.

Gardner, S.Y., J.L. Davis, S.L. Jones, D.H. LaFevers, M.S. Hoskins, E.M. McArver and M.G. Papich, Moxifloxacin pharmacokinetics in horses and disposition into phagocytes after oral dosing, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (2004), pp. 57-60.

Gehring, R. and G.W. Smith, An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29(4) (2006), pp. 237–241.

Gellert, M., K. Mizuuchi, M.H. O’Dea, T. Itoh and J.I. Tomizawa, Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of the America* 74 (1977), pp. 4772–4776.

Gibaldi, M. and P. Perrier, *Pharmacokinetics*, 2nd edn. (1982), pp. 1-494. Marcel Dekker Inc., New York.

Giles, C.J., W.T. Grimshaw, D.J. Shanks and D.J. Smith, Efficacy of danofloxacin in the therapy of acute bacterial pneumonia in housed beef cattle, *The Veterinary Record* 128(13) (1991), 296-300.

Goudah, A., Disposition kinetics of moxifloxacin in lactating ewes, *The Veterinary Journal* (2007). In Press.

Greene, C.E. and S.C. Budsberg, Veterinary use of quinolones. In: D.C. Hooper and J.S. Wolfson, Editors, *Quinolone Antimicrobial Agents*, American Society for Microbiology, Washington, DC (1993), pp. 473–488.

Griffiths, N.M., B.H. Hirst and N.L. Simmons, Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **269** (1994), pp. 496–502.

Guthrie, R.M., M. Jacobs, D.E. Low, L. Mandell and T. Slama, Treating resistant respiratory infections in the primary care setting: the role of the new quinolones, University of Cincinnati College of Medicine Continuing Medical Education (2004).

Hannan, P.C.T., G.D. Windsor, A. Jong, N. Schmeer, and M. Stegemann, Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41** (1997), pp. 2037-2040.

Haritova, A., L. Lashev and D. Pashov, Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep, *Research in Veterinary Science* **74** (2003), pp. 241-5.

Heinen, E., Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **25** (2002), pp. 1-5.

Hooper, D.C., Clinical applications of quinolones, *Biochimica et biophysica acta* **1400**(1-3) (1998), pp. 45-61.

Ibrahim, K.H., L.B. Hovde, G. Ross, B. Gunderson, D.H. Wright and J.C. Rotschafer, Microbiologic effectiveness of time- or concentration-based dosing strategies in *Streptococcus pneumoniae*, *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases* **44** (2002), pp. 265–271.

Inui, T., T. Taira, T. Matsushita and T. Endo, Pharmacokinetic properties and oral bioavailabilities of difloxacin in pig and chicken, *Xenobiotica* **28** (1998), pp. 887–893.

Ismail, M., Disposition kinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in calves, *Veterinary research communications* **31** (2007), pp. 467-76.

Jacoby, G.A., N. Chow and K.B. Waites, Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (2003), pp. 559–562.



Karabulut, N. and G.L. Drusano, Pharmacokinetics of the quinolone antimicrobial agents. In: D.C. Hooper and J.S. Wolfson, Editors, *Quinolone Antimicrobial Agents*, American Society for Microbiology, Washington, DC (1993), pp. 195–223.

Khodursky, A.B., E.L. Zechiedrich and N.R. Cozzarelli, Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*, *Proceedings for the National Academy of Sciences United States of the America* **92** (1995), pp. 11801–11805.

Kovar, A., C.T. Dalla and H. Derendorf, Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86** (1997), pp. 52–56.

Lees, P. and Shojaee F. Aliabadi, Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus human, *International Journal of Antimicrobial Agents* **19** (2002), pp. 269-284.

Lode, H., K. Borner and P. Koeppe, Pharmacodynamics of fluoroquinolones, *Clinical Infectious Diseases* **27** (1998), pp. 33–39.

MacGowan, A.P., C.A. Rogers, H.A. Holt, M. Wooton and K.E. Bowker, Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model of infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (2001), pp. 2916–2921.

McKellar, Q.A., I.F. Gibson and R.Z. McCormack, Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep, *Biopharmaceutics & drug disposition* **19** (1998), pp. 123-9.

Mahmood, I., Application of preclinical data to initiate the modified continual reassessment method for maximum tolerated dose-finding trials, *Journal of Clinical Pharmacology* **41** (2001), pp. 19–24.

Mann, D.D. and G.M. Frame, Pharmacokinetic study of danofloxacin in cattle and swine, *American Journal of Veterinary Research* **53** (1992), pp. 1022–1026.

Marangos, M.N., Z. Zhu, D.P. Nicolau, M.E. Klepser and C.H. Nightingale, Disposition of ofloxacin in female New Zealand White rabbits, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20** (1997), pp. 17-20.

Marín, P., C.M. Cárceles, E. Escudero and E. Fernández-Varón, Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats, *Canadian journal of veterinary research* **71** (2007a), pp. 74-76.

Marín, P., E. Escudero, E. Fernández-Varón and C.M. Cárceles, Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **30**(2007b), pp. 74-79.

Marín, P., E. Escudero, E. Fernández-Varón and C.M. Cárceles, Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats, *Journal of Dairy Science* **90**(9) (2007c), pp. 4219-25.

Martinez, M., P. McDermott and R. Walker, Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals, *The Veterinary Journal* **172**(1) (2006), pp. 10-28.

Martinez-Martinez, L., A. Pascual and G.A. Jacoby, Quinolone resistance from a transferable plasmid, *Lancet* **351** (1998), pp. 797–799.

Maxwell, A. and S.E. Critchlow, Mode of action. In: J. Kuhlman and H.J. Zeiler, Editors, *Quinolone Antibacterials*, Springer, Berlin (1998), pp. 119–166.

McKellar, Q.A., I.F. Gibson and R.Z. McCormack, Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep, *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **19** (1998), pp. 123–129.

Muller, M., H. Stab, M. Brunner, JG. Moller, E. Lackner and H.G. Eichler, Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (1999), pp. 2345–2349.

Munoz, R. and A.G. De La Campa, ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (1996), pp. 2252–2257.

Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima and H. Yoshida, *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33** (1989), pp. 254–255.

NCCLS, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document, M31-A2 (ISBN: 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, (2002).

Ng, E.Y., M. Trucksis and D.C. Hooper, Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (1996), pp. 1881-1888.

Nightingale, C.H., E.M. Grant and R. Quintiliani, Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin, *Chemotherapy* **46** (2000) (Suppl 1), pp. 6–14.

Nikaido, H. and M. Vaara, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, *Microbiological Reviews* **49** (1985), pp. 1–32.

Nix, D.E. and J.J. Schentag, The quinolones: an overview and comparative appraisal of their pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Journal of Clinical Pharmacology* **28** (1988), pp. 169–178.

Oethinger, M., W.V. Kern, A.S. Jellen-Ritter, L.M. McMurry and S.B. Levy, Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (2000), pp. 10–13.

Okazaki, O., C. Kojima, H. Hakusui and M. Nakashima, Enantioselective disposition of ofloxacin in humans, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35** (1991), pp. 2106–2109.

Owens Jr., R.C. and P.G. Ambrose, Pharmacodynamics of quinolones. In: C.H. Nightingale, T. Murakawa and R.C. Owens Jr., Editors, *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY (2002a), pp. 155–176.

Owens Jr., R.C. and P.G. Ambrose, Torsades de pointes associated with fluoroquinolones, *Pharmacotherapy* **22** (2002b), pp. 663–668.

Park, S.C. and H.I. Yun, Clinical pharmacokinetics of norfloxacin-glycine acetate after intravenous and intramuscular administration to horses, *Research in Veterinary Science* **74** (2003), pp. 79-83.

Piddock, L.J., V. Ricci, I. McLaren and D.J. Griggs, Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41** (1998), pp. 635–641.

Poole, K., Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative

bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (2000), pp. 2233–2241.

Power, J., Statistical analysis of pharmacokinetics data, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **13** (1990), pp. 113-120.

Preston, S.L., G.L. Drusano, A.L. Berman, C.L. Fowler, A.T. Chow, B. Dornseif, V. Reichl, J. Natarajan and M. Corrado, Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials, *Journal of the American Medical Association* **279** (1998), pp. 125–129.

Rabbaa, L., S. Dautrey, N. Colas-Linhart, C. Carbon and R. Farinotti, Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (1997), pp. 2274–2277.

Radandt, J.M., C.R. Marchbanks and M.N. Dudley, Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management, *Clinical Infectious Diseases* **14** (1992), pp. 272–284.

Satoh, Y., A. Sugiyama, K. Chiba, K. Tamura and K. Hashimoto, QT-prolonging effects of sparfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, assessed in the in vivo canine model with monophasic action potential monitoring, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36** (2000), pp. 510–515.

Shem-Tov, M., O. Rav-Hon, G. Ziv, E. Lavi, A. Glickman and A. Saran, Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **21** (1998), pp. 209-213.

Shojaee Aliabadi, F. and P. Lees, Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf, *Research in Veterinary Science* **74**(3) (2003), pp. 247-59.

Siefert, H.M., A. Domdey-Bette, K. Henninger, F. Hucke, C. Kohlsdorfer and H.H. Stass, Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43** (1999) (Suppl B), pp. 69–76.

Takiff, H.E., L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W.M. Huang, B. Kreiswirth, S.T. Cole, W.R. Jacobs Jr. and A. Telenti, Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38** (1994), pp. 773–780.

Taylor, D.E. and A.S. Chau, Cloning and nucleotide sequence of the *gyrA* gene from *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 and characterization of ciprofloxacin-

resistant laboratory and clinical isolates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (1997), pp. 665–671.

Thomas, J.K., A. Forrest, S.M. Bhavnani, J.M. Hyatt, A. Cheng, C.H. Ballow and J.J. Schentag, Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42** (1998), pp. 521–527.

Toutain, P.L. and P. Lees, Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **27** (2004), pp. 467-77.

Toutain, P.L., J.R. del Castillo and A. Bousquet-Melou, The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics, *Research in Veterinary Science* **73** (2002), pp. 105–114.

Tran, J.H. and G.A. Jacoby, Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of the America* **99** (2002), pp. 5638–5642.

Turnidge, J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones, *Drugs* **58**(2) (1999), pp. 29-36.

Van Boven, M., K.T. Veldman, M.C. de Jong and D.J. Mevius, Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52** (2003), pp. 719–723.

Vancutsem, P.M., J.G. Babish and W.S. Schwark, The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity, *Cornell Veterinarian* **80** (1990), pp. 173–186.

Vesga, O., R. Conklin, T. Stamstad and W.A. Craig, Pharmacodynamic activity of Bay 12-0839 in animal infection models, *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, LA, American Society for Microbiology, Washington, DC* (1996), p. 123 Abstract F22.

Vila, J., J. Ruiz, P. Goni and M.T. De Anta, Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (1996), pp. 491–493.

Walker, R.D., The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy, *Australian Veterinary Journal* **78** (2000), pp. 84–90.

Wamberg, S., N.C.F. Sandgaard and P. Bie, Simultaneous determination of total body water and plasma volume in conscious dogs by the indicator dilution principle, *Journal of Nutrition* **132** (2002), pp. 1711S–1713S.

Wang, M., J.H. Tran, G.A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang and D.C. Hooper, Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (2003), pp. 2242–2248.

Wang, Y., W.M. Huang and D.E. Taylor, Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37** (1993), pp. 457–463.

Waxman, S., C. Rodriguez, F. Gonzalez, M.L. De Vicente, M.I. San Andres and M.D. San Andres, Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats, *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* **24** (2001), pp. 375–378.

Willmott, C.J., S.E. Critchlow, I.C. Eperon and A. Maxwell, The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase, *Journal of Molecular Biology* **242** (1994), pp. 351–363.

Wright, D.H., G.H. Brown, M.L. Peterson and J.C. Rotschafer, Application of fluoroquinolone pharmacodynamics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46** (2000), pp. 669–683.

Xuan, D., M. Zhong, H. Mattoes, K.Q. Bui, J. McNabb, D.P. Nicolau, R. Quintiliani and C.H. Nightingale, Streptococcus pneumoniae response to repeated moxifloxacin or levofloxacin exposure in a rabbit tissue cage model, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45(3)** (2001), pp. 794–9.

Yamaoka, K., T. Nakagawa and T. Uno, Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations, *Journal Pharmacokinetics Biopharmaceutics* **6** (1978), pp. 165-175.

Yamaoka, K., Y. Tamigawara, and J. Uno, A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputers, *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **4** (1981), pp. 879-885.

Yoon, J.H., R.L. Brooks Jr., A. Khan, H. Pan, J. Bryan, J. Zhang, S.C. Budsberg, P.O. Mueller and J. Halper, The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horse tendon cells, *Cell Biology Toxicology* **20** (2004), pp. 41–54.

Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura and S. Nakamura, Quinolone resistance-

determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34** (1990), pp. 1271–1272.

Yoshida, H., T. Kojima, J. Yamagishi and S. Nakamura, Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*, *Molecular and General Genetics* **211** (1988), pp. 1–7.

Zechiedrich, E.L. and N.R. Cozzarelli, Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*, *Genes and Development* **9** (1995), pp. 2859–2869.

Zhanel, G.G., Influence of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles on Antibiotic Selection, *Current Infectious Disease Report* **3** (2001), pp. 29–34.

## **15.- APÉNDICES/APPENDIXES**



15.1. GRÁFICOS/FIGURES

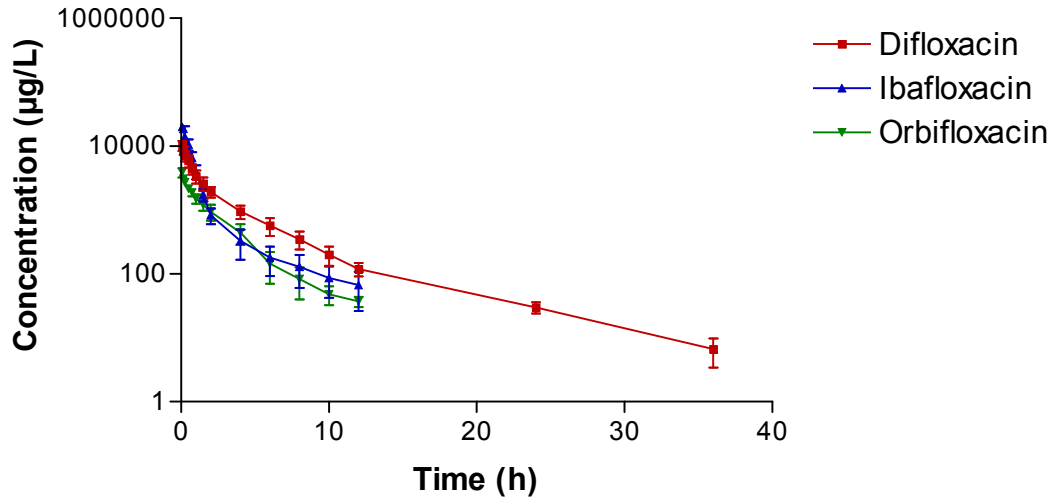


Figure 1: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intravenous dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg), orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) and ibafloxacin (dose: 15 mg/kg) in goats.

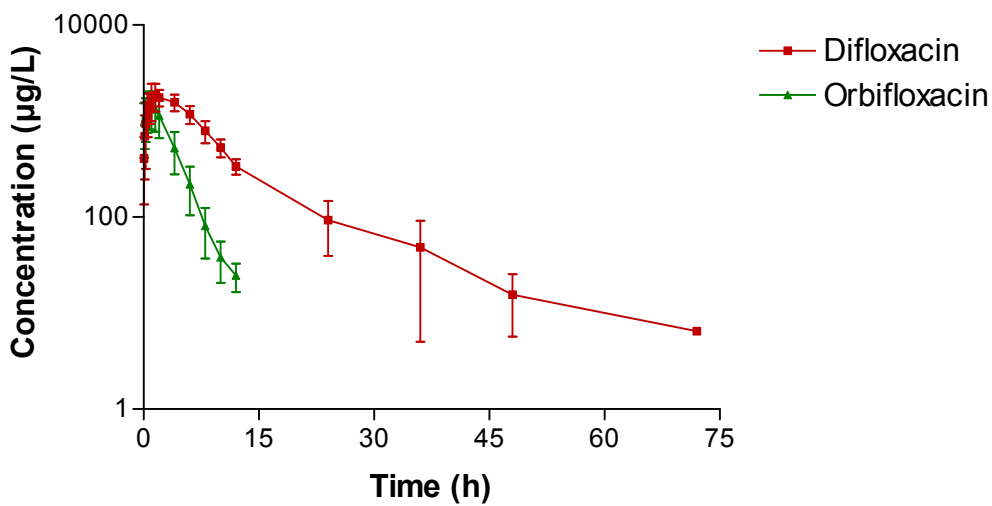


Figure 2: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intramuscular dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) and orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

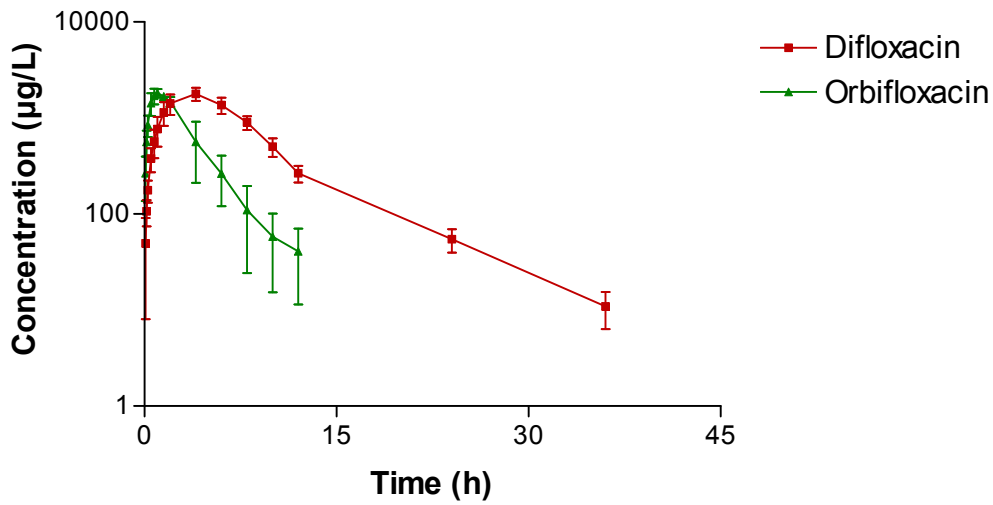


Figure 3: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single subcutaneous dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) and orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

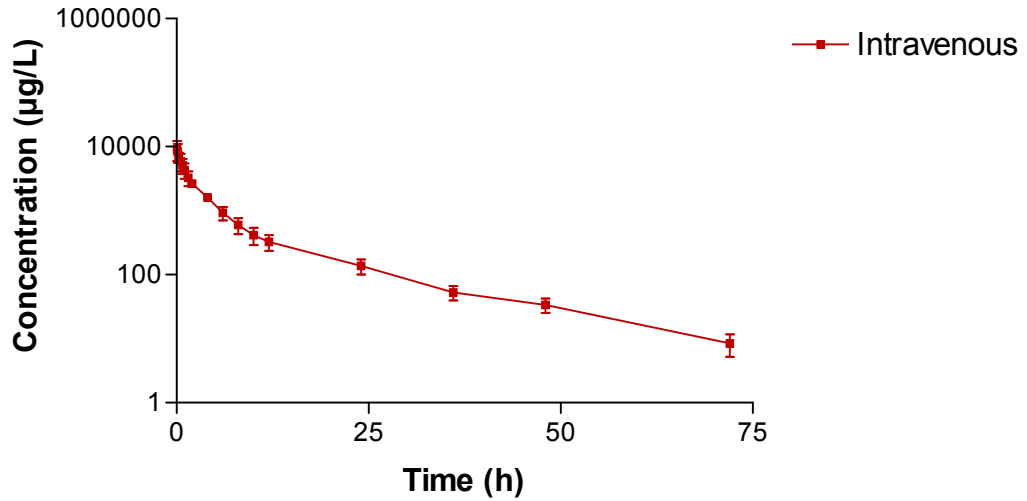


Figure 4: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after intravenous administration at a single dose of 5 mg/kg in sheep.

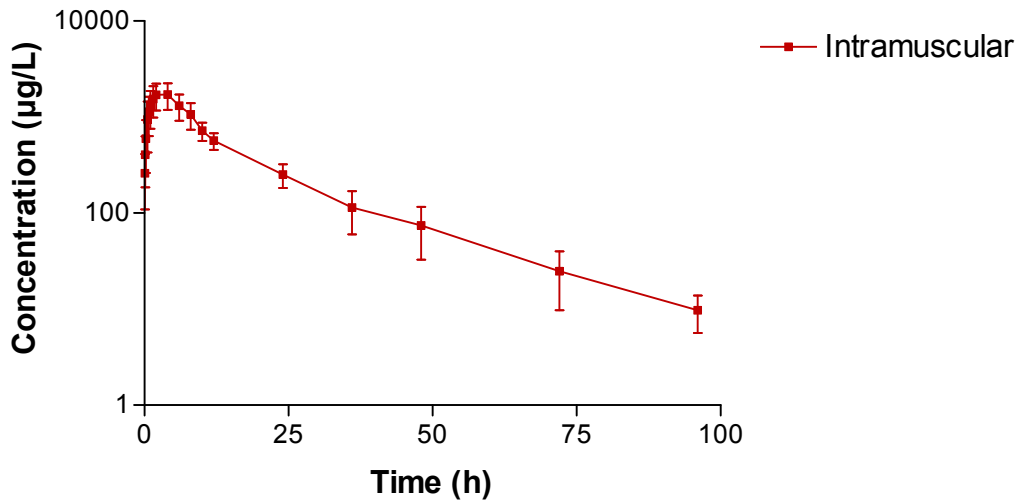


Figure 5: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after intramuscular administration at a single dose of 5 mg/kg in sheep.

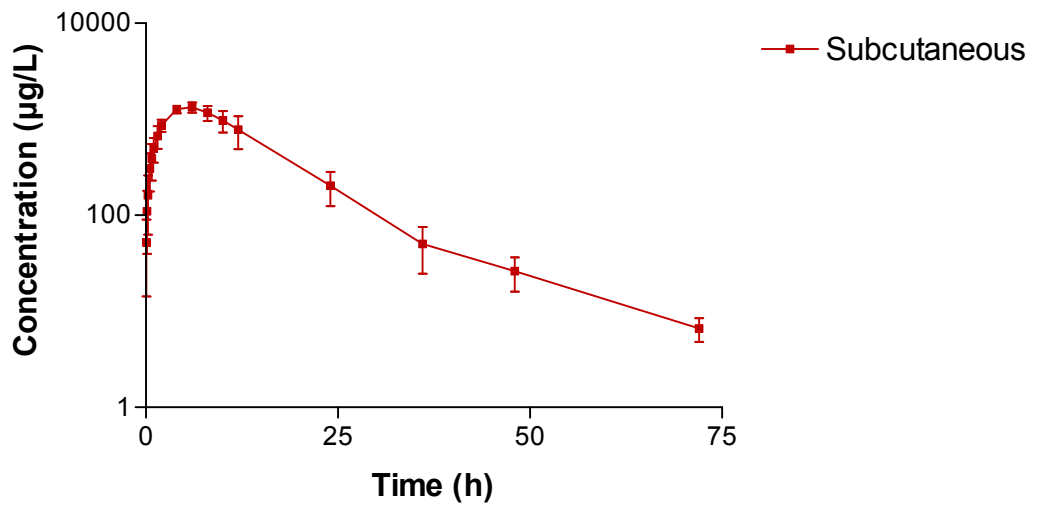


Figure 6: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after subcutaneous administration at a single dose of 5 mg/kg in sheep.

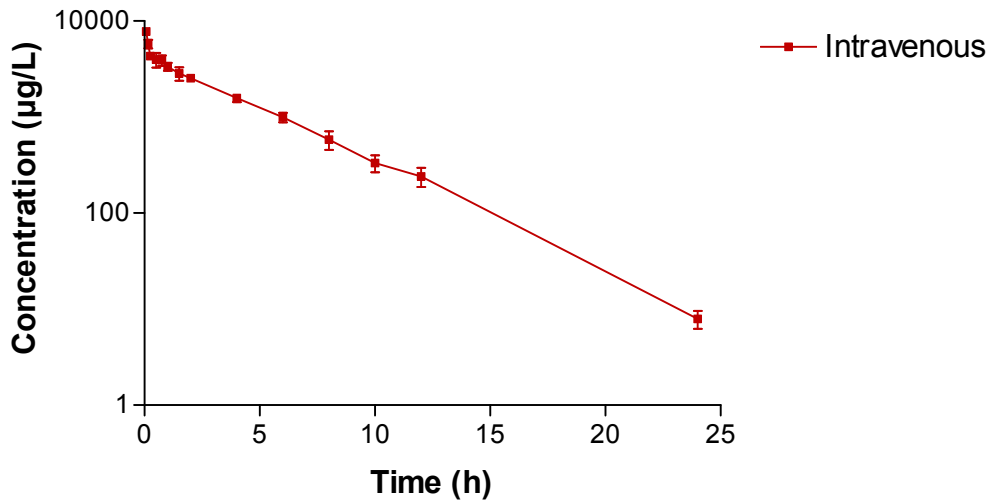


Figure 7: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after intravenous administration at a single dose of 5 mg/kg in horses.

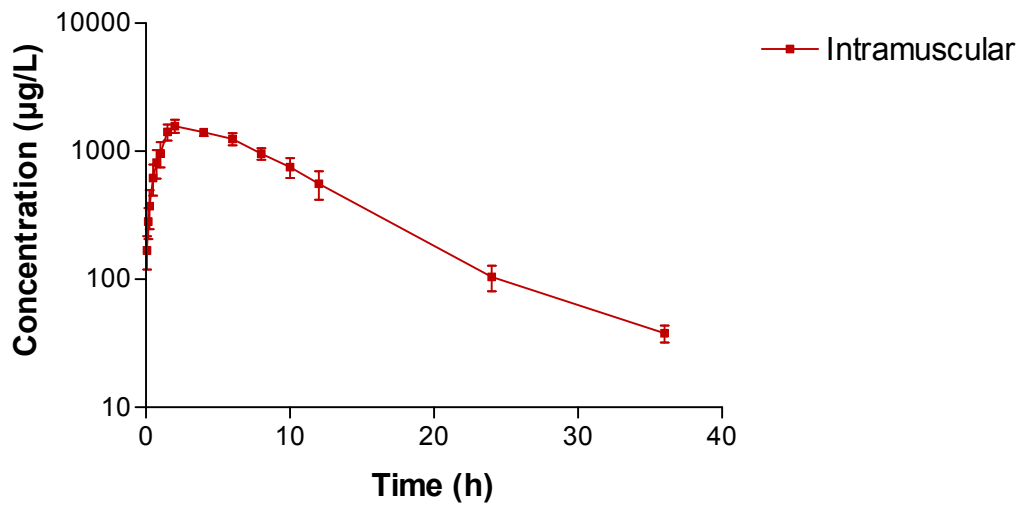


Figure 8: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after intramuscular administration at a single dose of 5 mg/kg in horses.

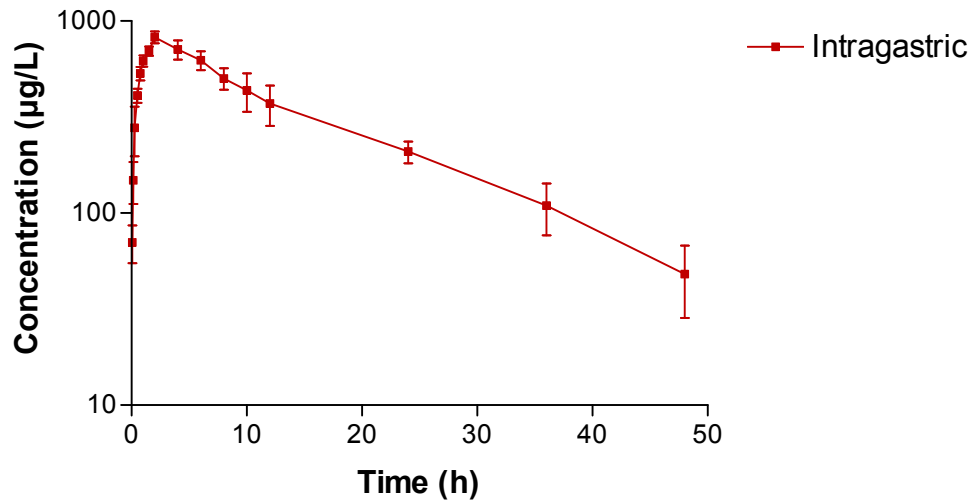


Figure 9: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of difloxacin after intragastric administration at a single dose of 5 mg/kg in horses.

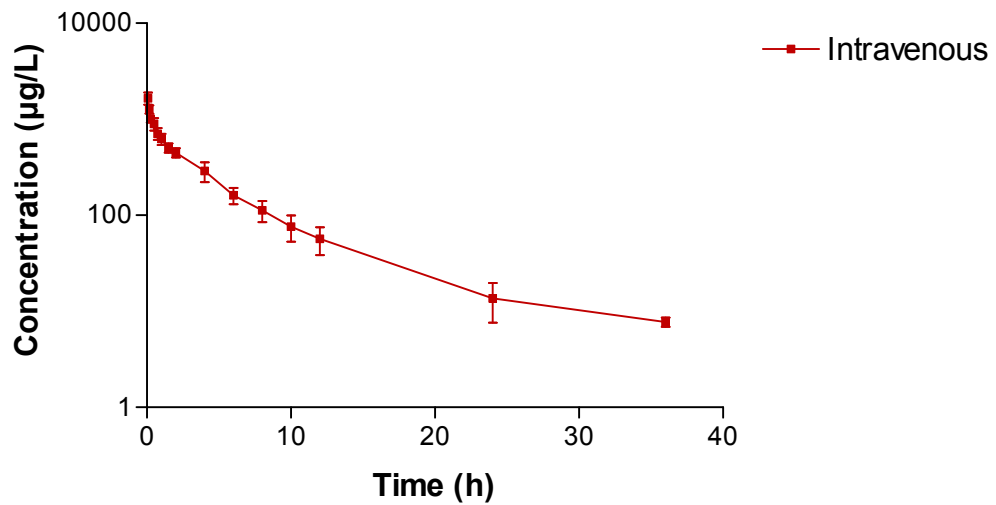


Figure 10: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of danofloxacin after intravenous administration at a single dose of 1.25 mg/kg in horses.

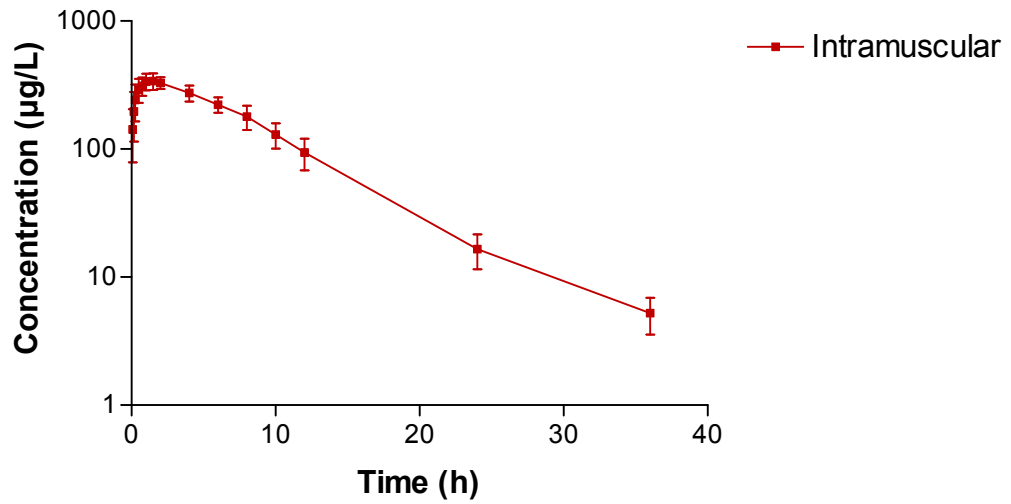


Figure 11: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of danofloxacin after intramuscular administration at a single dose of 1.25 mg/kg in horses.

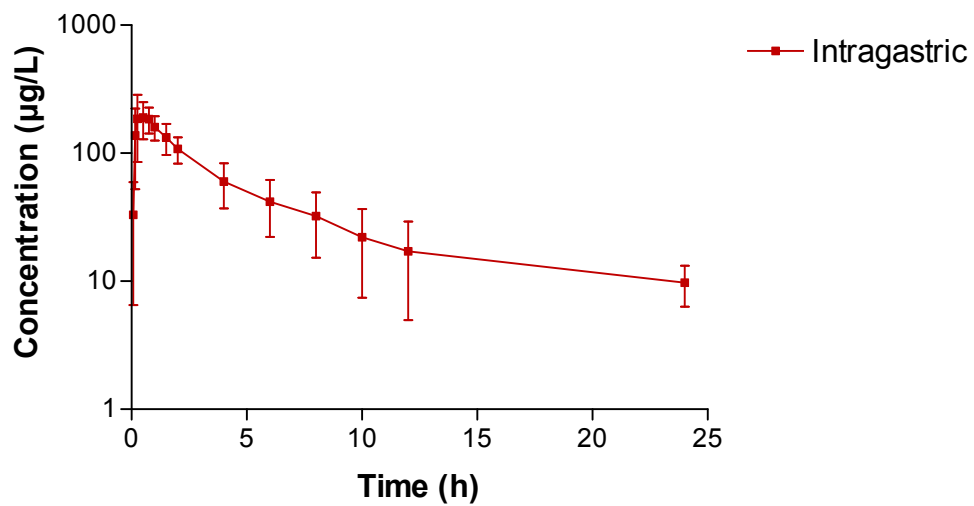


Figure 12: Semilogarithmic plot of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) of danofloxacin after intragastric administration at a single dose of 1.25 mg/kg in horses.

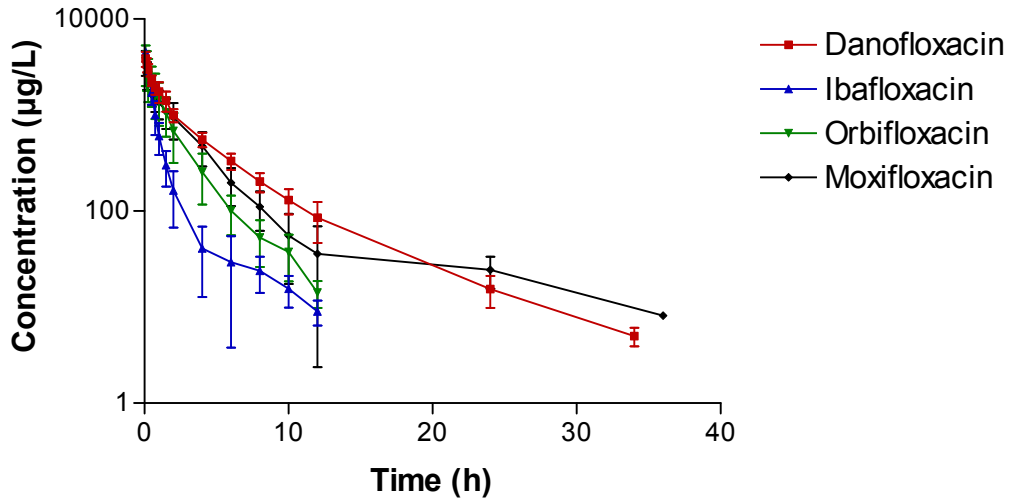


Figure 13: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intravenous dose of danofloxacin (dose: 6 mg/kg), orbifloxacin (dose: 5 mg/kg), moxifloxacin (dose: 5 mg/kg) and ibafloxacin (dose: 15 mg/kg) in rabbits.

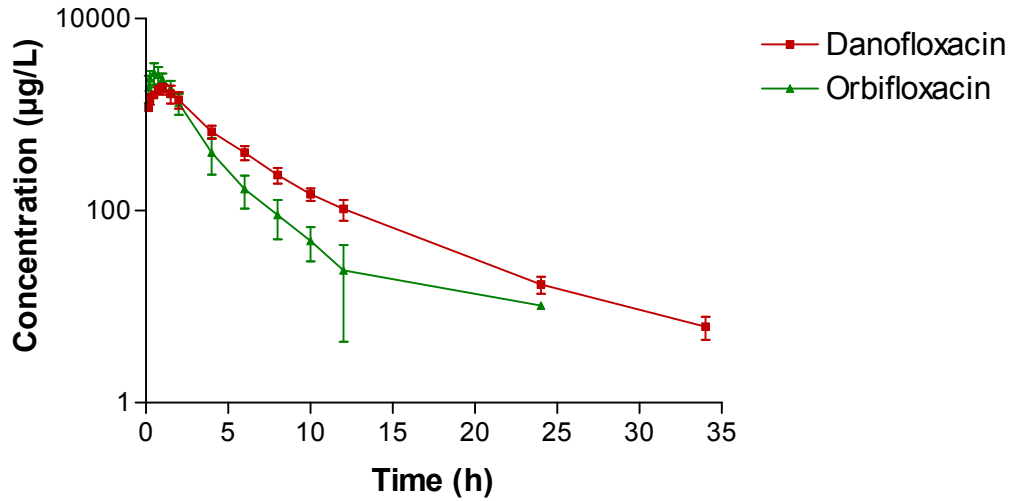


Figure 14: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intramuscular dose of danofloxacin (dose: 6 mg/kg) and orbifloxacin (dose: 5 mg/kg) in rabbits.

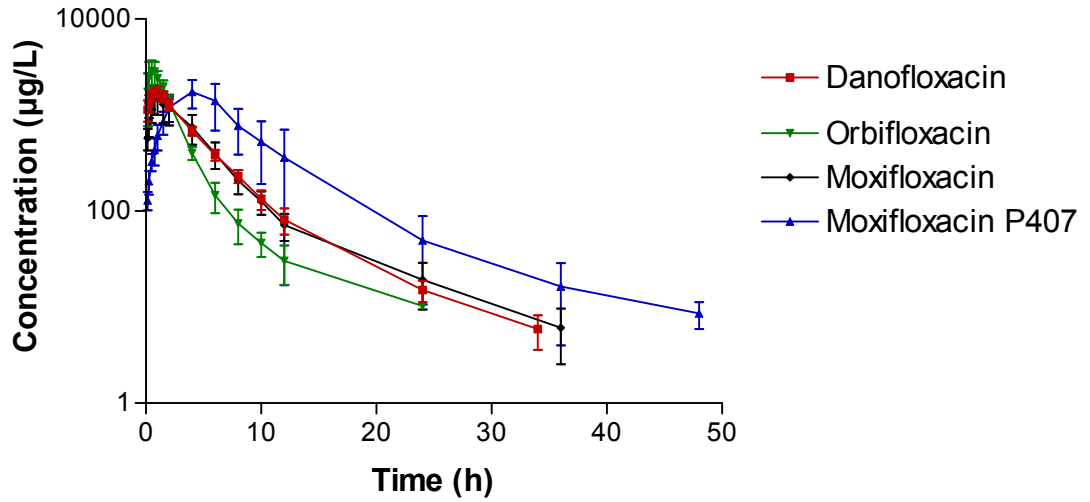


Figure 15: Semilogarithmic plots of plasma concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single subcutaneous dose of danofloxacin (dose: 6 mg/kg), orbifloxacin (dose: 5 mg/kg), moxifloxacin (dose: 5 mg/kg) and moxifloxacin-P407 (dose: 30 mg/kg) in rabbits.

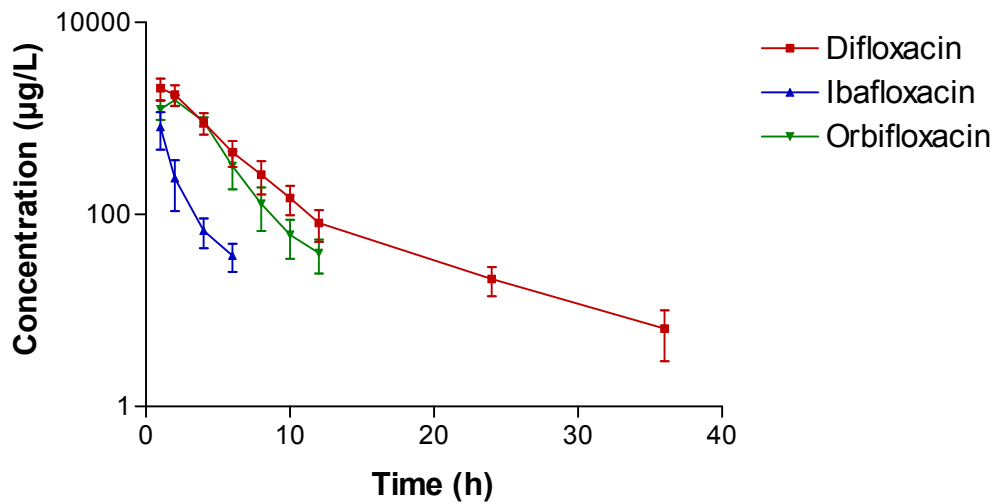


Figure 16: Semilogarithmic plots of milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intravenous dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg), orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) and ibafloxacin (dose: 15 mg/kg) in goats.



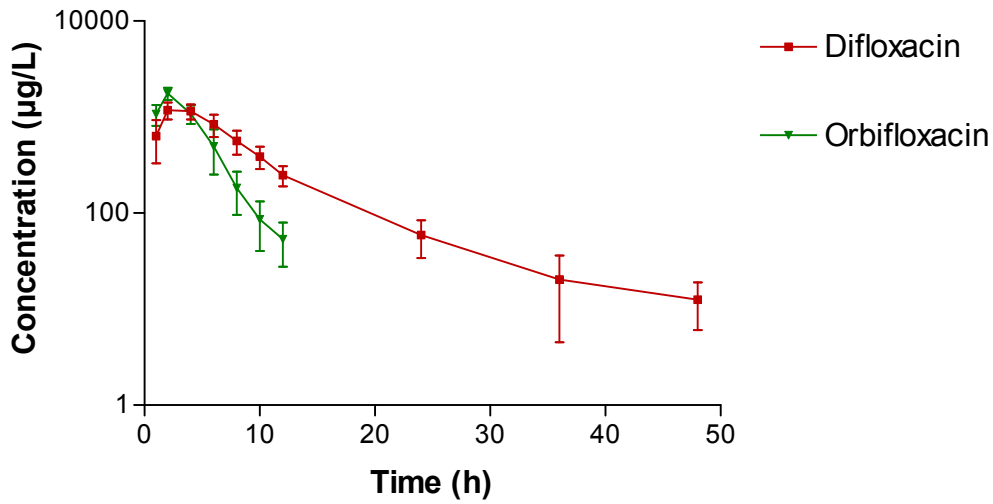


Figure 17: Semilogarithmic plots of milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intramuscular dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) and orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

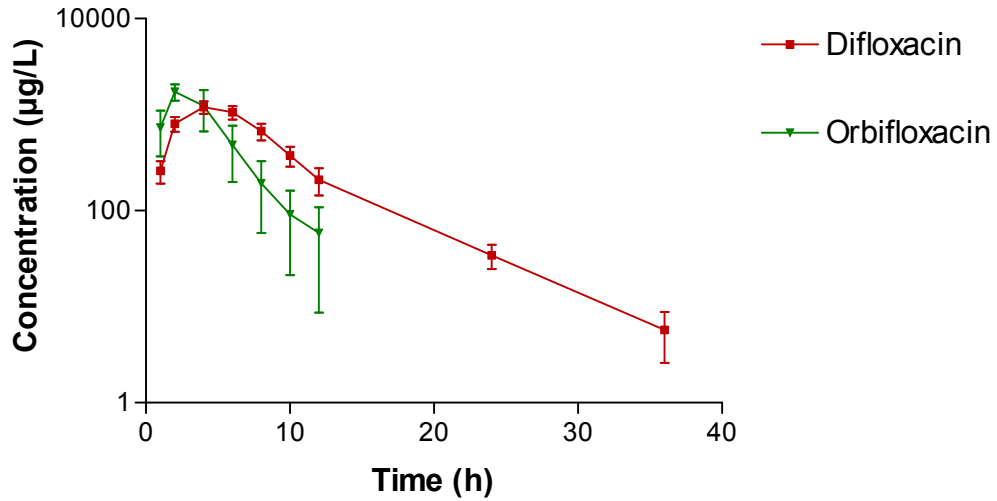


Figure 18: Semilogarithmic plots of milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single subcutaneous dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) and orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

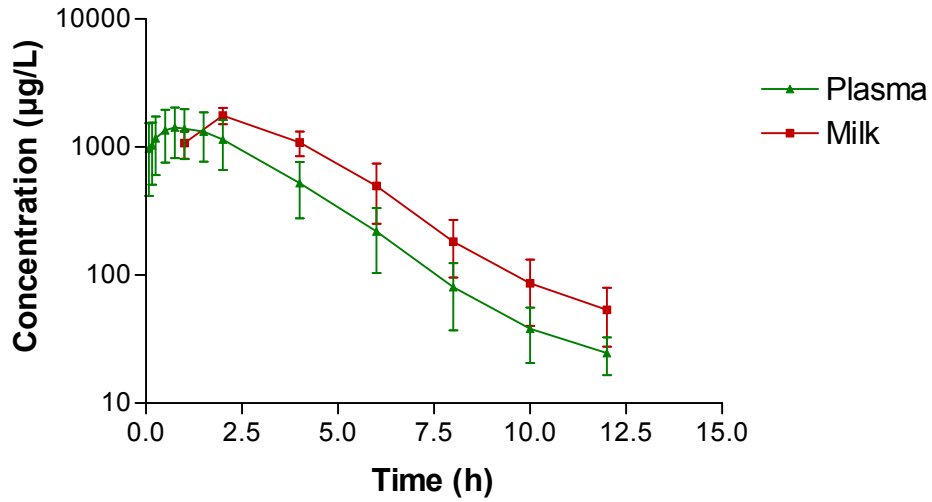


Figure 19: Semilogarithmic plots of plasma and milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intramuscular dose of orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

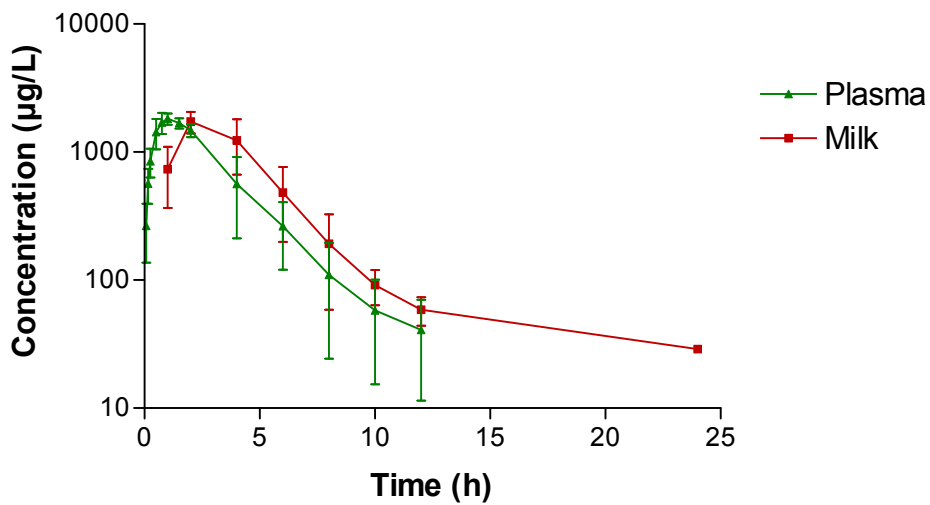


Figure 20: Semilogarithmic plots of plasma and milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single subcutaneous dose of orbifloxacin (dose: 2.5 mg/kg) in goats.

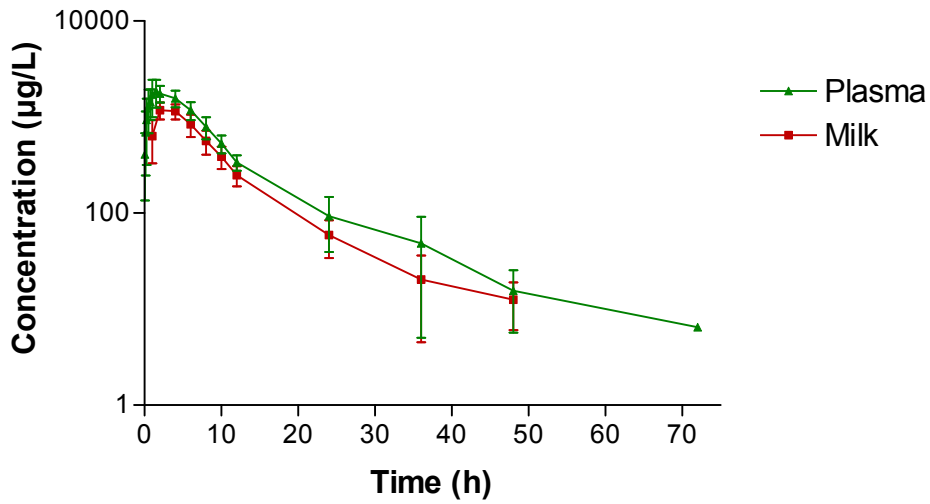


Figure 21: Semilogarithmic plots of plasma and milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single intramuscular dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) in goats.

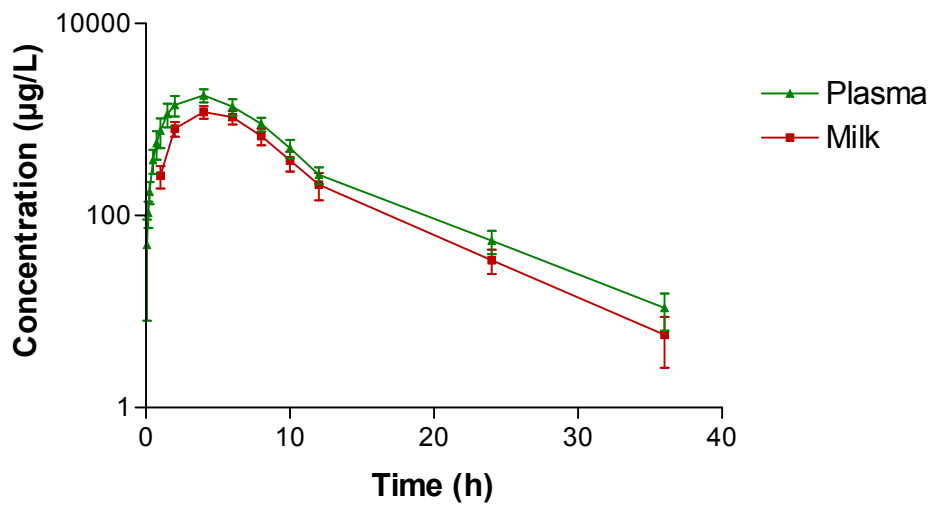


Figure 22: Semilogarithmic plots of plasma and milk concentrations (mean  $\pm$  SD) following a single subcutaneous dose of difloxacin (dose: 5 mg/kg) in goats.

**15.2. ÍNDICES DE IMPACTO/IMPACT FACTOR**

<b>JOURNAL TITLE</b>	<b>RANK</b>	<b>IMPACT FACTOR</b>
EQUINE VETERINARY JOURNAL	13/129	1.730
JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS	22/129	1.406
RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE	28/129	1.258
AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH	30/129	1.241
CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH	44/129	0.960
JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE SERIES A	67/129	0.627
JOURNAL OF DAIRY SCIENCE	2/44	2.284
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE	49/56	0.880