



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio Farmacocinético de Formulaciones Poliméricas
de Liberación Controlada y Excreción en Leche de
Ceftiofur en Caprino**

**D. Carlos Cárceles García
2016**



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE FORMULACIONES POLIMÉRICAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y EXCRECIÓN EN LECHE DE CEFTIOFUR EN CAPRINO

Memoria presentada por Carlos Cárceles
García, para optar al Grado de Doctor en
Medicina

2016

DEDICATORIA

A mis padres, Ana y Carlos, por todo el apoyo dado en estos años.

A mi director de tesis, Emilio, por su guía y ayuda en la realización de la misma.

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:

Al director de esta tesis, el Dr. Emilio Fernández Varón por acogerme dentro de su Grupo de investigación y hacerme partícipe de sus proyectos. Sin su tesón, ayuda y guía este trabajo no habría sido posible. Muchas gracias por ello y por el tiempo dedicado, su apoyo y su confianza.

Al Dr. Juan Manuel Serrano Rodríguez por sus indicaciones y su inestimable ayuda en el análisis de los datos y en la realización del estudio microbiológico, que han resultado imprescindibles.

Al Dr. Carlos Cárcelos Rodríguez, quien siempre me ha mostrado su interés, su estímulo y ayuda.

A Verónica, técnico del Departamento de Farmacología, por su ayuda y predisposición a la hora de llevar a cabo las determinaciones analíticas necesarias para el desarrollo de este trabajo.

Al Director de la Granja del IMIDA de Murcia, Juan Carrizosa Durán y a su equipo de trabajo, Antonio, Ángel y Miguel, por poner a nuestra disposición los animales empleados en el presente trabajo.

Muchas gracias a todos.

Esta tesis ha sido financiada por la Fundación Séneca (Agencia Regional de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia) en el marco del proyecto de investigación Optimización del uso de cefalosporinas (ceftiofur y cefquinome) mediante nuevas formulaciones de liberación sostenida parenterales en caprino. Proyecto 11850/PI/09 .

ÍNDICE.

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1.- Estructura química y clasificación	9
2.1.1.- Estructura química	10
2.1.2.- Clasificación	11
2.2.- Relación estructura y actividad	18
2.3.- Mecanismo de acción	20
2.4.- Integración Farmacocinética-Farmacodinámica	26
2.5.- Espectro antibacteriano	31
2.5.1.- Espectro antibacteriano de las cefalosporinas de primera generación	31
2.5.2.- Espectro antibacteriano de las cefalosporinas de segunda generación	32
2.5.3.- Espectro antibacteriano de las cefalosporinas de tercera generación	33
2.5.4.- Espectro antibacteriano de las cefalosporinas de cuarta generación	34
2.5.5.- Espectro antibacteriano de las cefalosporinas de quinta generación	35
2.6.- Mecanismos de resistencia	36
2.6.1.- Modificación de las dianas de acción	36
2.6.2.- Producción de betalactamasas	38
2.6.2.1.- Clasificación de las betalactamasas	38
2.6.2.2.- Betalactamsas de espectro extendido	41
2.7.- Propiedades farmacocinéticas	42
2.7.1.- Absorción y biodisponibilidad	42
2.7.2.- Distribución	44
2.7.3. Metabolismo y excreción	46
2.8. - Interacciones	47
2.9.- Toxicidad y efectos adversos	49
2.9.1.- Reacciones adversas gastrointestinales	49
2.9.2.- Reacciones adversas hematológicas	49
2.9.3.- Reacciones adversas hepáticas	50
2.9.4.- Reacciones adversas renales	51
2.9.5.- Reacciones adversas sobre el sistema nervioso central	51
2.9.6.- Reacciones adversas alérgicas	52
2.9.7.- Reacciones adversas cardíacas	53
2.10.- Aplicaciones terapéuticas de las cefalosporinas	54
2.11.- Ceftiofur	56

2.11.1.- Estructura química y relación estructura-actividad	56
2.11.2.- Espectro antibacteriano	58
2.11.3.- Indicaciones clínicas	61
2.11.4.- Posología, forma de administración y duración del tratamiento	65
2.11.5.- Tiempo de espera	67
2.11.6.- Reacciones adversas	68
2.11.7.- Interacciones	70
2.11.8.- Propiedades farmacocinéticas	71
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	79
3.1.- Material	81
3.1.1.- Material fungible	81
3.1.2.- Productos y reactivos	81
3.1.3.- Aparataje	82
3.1.4.- Software informático	83
3.2.- Animales	84
3.3.- Medicamentos	84
3.4.- Protocolo experimental	85
3.4.1.- Administración intravenosa	86
3.4.2.- Administración subcutánea	86
3.4.3.- Recogida de muestras de leche	87
3.5.- Técnicas analíticas	87
3.5.1.- Preparación de las muestras	88
3.5.2.- Extracción en fase sólida	88
3.5.3.- Cuantificación cromatográfica	89
3.6.- Validación del Método	90
3.6.1.- Linealidad	90
3.6.2.- Recuperación	90
3.6.3.- Precisión	91
3.6.4.- Límite de cuantificación	92
3.7.- Análisis farmacocinético	92
3.7.1.- Análisis compartimental. Plasma	92
3.7.2.- Análisis no compartimental. Plasma	93
3.7.3.- Estimación de la absorción <i>in vivo</i> mediante deconvolución	94
3.8.- Métodos estadísticos	94

3.9.- Análisis microbiológicos: concentraciones mínimas inhibitorias y preventivas de mutantes (CMI y CPM).	95
3.9.1.- Concentraciones mínimas inhibitorias	95
3.9.2.- Concentraciones preventivas de mutantes.	96
3.9.3.- Actividad <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> de ceftiofur frente a cepas de campo: curvas de letalidad	98
4.- RESULTADOS	101
4.1.- Administración intravenosa de ceftiofur	103
4.2.- Administración subcutánea de ceftiofur en formulación convencional	107
4.3.- Administración subcutánea de ceftiofur en solución del polímero P407 al 25%+ carboximetilcelulosa al 2%	112
4.4.- Comparación de los parámetros farmacocinéticos de ceftiofur tras su administración intravenosa, subcutánea y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	116
4.5.- Evaluación de la absorción <i>in vivo</i> mediante deconvolución	121
4.6.- Excreción en leche de ceftiofur tras su administración intravenosa y subcutánea en formulación convencional (sc1) y formulación con polímero p407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	130
4.7.- Análisis microbiológicos: concentración mínima inhibitoria, preventiva de mutantes y curvas de letalidad de ceftiofur frente a cepas de campo de <i>mannheimia haemolytica</i> . Estudios <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> .	130
4.7.1.- CMI y CPM e integración PK/PD	130
4.7.2.- Estudio <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> : curvas de letalidad	136
5.- DISCUSIÓN	143
5.1.- Introducción	145
5.2.- Administración intravenosa de ceftiofur en cabras	146
5.2.1.- Modelo farmacocinético	146
5.2.2.- Parámetros farmacocinéticos	148
5.2.2.1.- Constantes híbridas de disposición rápida y lenta	149
5.2.2.2.- Microconstantes	150
5.2.2.3.- Semivida	152
5.2.2.4.- Área Bajo la Curva	153
5.2.2.5.- Tiempo Medio de Residencia	154
5.2.2.6.- Aclaramiento plasmático	154
5.2.2.7.- Volúmenes de distribución aparente	155
5.3.- Administración subcutánea de ceftiofur en cabras	157
5.3.1.- Modelo farmacocinético	157

5.3.2.- Parámetros farmacocinéticos	159
5.3.2.1.- Semivida	159
5.3.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	160
5.3.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	161
5.3.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	162
5.3.2.5.- Tiempo Medio de Residencia y Tiempo medio de Residencia de Absorción	163
5.4.- Administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% en cabras	164
5.4.1.- Modelo farmacocinético	164
5.4.2.- Parámetros farmacocinéticos	166
5.4.2.1.- Semivida	166
5.4.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	167
5.4.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	168
5.4.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	168
5.4.2.5.- Tiempo Medio de Residencia y Tiempo medio de Residencia de Absorción	169
5.5.- Comparación entre administraciones	170
5.5.1.- Semivida ($t_{1/2,z}$)	171
5.5.2.- Tiempo medio de residencia (MRT)	172
5.5.3.- Constante de absorción (k_a)	173
5.5.4.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	174
5.5.5.- Tiempo medio de absorción (MAT)	176
5.5.6.- Área bajo la curva (AUC)	177
5.4.7.- Biodisponibilidad (F)	178
5.6.- Estudio farmacocinético de la absorción extravascular de ceftiofur mediante deconvolución	179
5.7.- Integración farmacocinética/farmacodinámica	184
5.8.- Estudio <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> . Curvas de letalidad	189
6.- CONCLUSIONES	193
7.- RESUMEN	197
8.- SUMMARY	201
9.- BIBLIOGRAFÍA	205
10.- ABREVIATURAS	229

**ÍNDICE DE FIGURAS,
CUADROS, GRÁFICOS
Y TABLAS.**

CUADROS.

Cuadro 1.- Clasificación de Amber de β -lactamasas. **40**

Cuadro 2.- Beta-lactamasas: clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros. **41**

FIGURAS.

Figura 1.- Anillo β -lactámico y grupos de los diversos tipos de antibióticos β -lactámicos. **9**

Figura 2.- Ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y núcleo básico de las cefalosporinas. **11**

Figura 3.- Pared celular y membrana citoplasmática de *E. coli*. **20**

Figura 4.- Estructura de las cadenas de N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM). **21**

Figura 5.- Estructura peptidoglicano en gramnegativos (A) y grampositivos (B). **22**

Figura 6.- Síntesis peptidoglicano: fases y localización de las mismas. **23**

Figura 7.- Estructura de pared bacteriana de grampositivas y gramnegativas. **24**

Figura 8.- Farmacodinamia de antibacterianos con acción tiempo-dependiente. **27**

Figura 9.- Objetivos farmacodinámicos más evaluados para las distintas familias de antimicrobianos. **28**

Figura 10.- Estructura química del ceftiofur. **57**

Figura 11.- Representación esquemática del modelo bicompartimental abierto tras la administración intravenosa de un fármaco. **151**

Figura 12.- Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración extravascular de un fármaco. **158**

Figura 13.- Proceso de obtención de la fracción de fármaco que accede al compartimento central tras una administración extravascular mediante deconvolución. **180**

GRÁFICOS

Gráfico 1.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F). **104**

Gráfico 2.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg. **105**

Gráfico 3.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg, a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F). **109**

Gráfico 4.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg. **110**

Gráfico 5.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F). **113**

Gráfico 6.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración subcutánea de la formulación SC2 a una dosis de 6 mg/kg. **114**

Gráfico 7.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **118**

Gráfico 8.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea (SC1), y una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **118**

Gráfico 9.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra. **123**

Gráfico 10.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra. **124**

Gráfico 11.- Representación gráfica de la fracción absorbida y la velocidad de absorción promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg. **125**

Gráfico 12.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra. **126**

Gráfico 13.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a dosis de 6 mg/kg a cada cabra. **127**

Gráfico 14.- Representación gráfica de la fracción absorbida y la velocidad de absorción promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a una dosis de 6 mg/kg. **128**

Gráfico 15.- Representación gráfica de las velocidades de absorción promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg. **129**

Gráfico 16.- Representación gráfica de las fracciones absorbidas promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg. **129**

Gráfico 17.- Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 24 horas. **132**

Gráfico 18.- Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 72 horas. **132**

Gráfico 19.- Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg) y SC2 (6 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T> CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino. **133**

Gráfico 20.- Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg) y SC2 (2 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino. **134**

Gráfico 21.- Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (6 mg/kg) y SC2 (6 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino. **134**

Gráfico 22.- Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg/q12h) y SC2 (6 mg/kg/q24h) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino. **135**

Gráfico 23.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiples de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de dos ensayos *in vitro* en diferentes días. **138**

Gráfico 24.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiples de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de dos ensayos *in vitro* en diferentes días. **138**

Gráfico 25.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiples de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de cuatro ensayos *in vitro* en diferentes días. **139**

Gráfico 26.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur intravenosos (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **140**

Gráfico 27.-Curvas de letalidad de *M. Haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur subcutáneas SC1 (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **141**

Gráfico 28.-Curvas de letalidad de *M. Haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur subcutáneas SC2 (6 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **142**

Gráfico 29.-Tiempos de vida media ($t_{1/2\lambda z}$) obtenidos en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **171**

Gráfico 30.- Tiempo medio de residencia (MRT) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV), subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **172**

Gráfico 31.- Constante de absorción (k_a) obtenida en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **174**

Gráfico 32.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **175**

Gráfico 33.- Concentraciones plasmáticas máximas ($C_{m\acute{a}x}$) obtenidas en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. A la derecha, los valores de $C_{m\acute{a}x}$ de ceftiofur tras su administración vía SC2, están corregidos a una dosis de 2 mg/kg*. **175**

Gráfico 34.- Tiempo medio de absorción (MAT) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **176**

Gráfico 35.- Área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) obtenidos en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. En la derecha, el valor de $AUC_{0-\infty}$ de ceftiofur tras su administración vía SC2, está corregido a una dosis de 2 mg/kg*. **177**

Gráfico 36.- Biodisponibilidad obtenida en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. **179**

Gráfico 37.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 (arriba).
Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 (abajo). **181**

Gráfico 38.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2, y 6 mg/kg y normalizadas a 2 mg/kg. **183**

Gráfico 39.- Cantidades absorbidas para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2 y 6 mg/kg y normalizadas a 2 mg/kg (derecha). **183**

Gráfico 40.- Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2 y 6 mg/kg. **183**

Gráfico 41.- Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 24 y 72 horas. **186**

TABLAS

Tabla 1.- Esquema del diseño cruzado utilizado en la experiencia. **85**

Tabla 2.- Dosis de antibiótico utilizada según el peso de cada animal. **85**

Tabla 3.- Porcentajes de recuperación de ceftiofur en suero y en leche. **91**

Tabla 4.- Porcentajes de desviación estándar relativa de ceftiofur en suero y en leche intra-día e inter-día. **91**

Tabla 5.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados. **103**

Tabla 6.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración intravenosa de ceftiofur a dosis de 2mg/kg. **105**

Tabla 7.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración intravenosa de ceftiofur, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste, junto con los parámetros estadísticos asociados. **106**

Tabla 8.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración intravenosa de ceftiofur a dosis de 2 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados. **107**

Tabla 9.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados. **108**

Tabla 10.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración subcutánea SC1 de ceftiofur a dosis de 2mg/kg. **110**

Tabla 11.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1), a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados. **111**

Tabla 12.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1; 2 mg/kg) junto con sus valores medios y estadísticos asociados. **111**

Tabla 13.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en µg/L, en cada cabra tras la administración subcutánea de la formulación P407/CMC (SC2) de una dosis de 6 mg/kg. **112**

TABLA 14.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración subcutánea de ceftiofur en formulación P407/CMC (SC2) a dosis de 6mg/kg. **114**

Tabla 15.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC2), a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados. **115**

Tabla 16.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC2) a dosis de 6 mg/kg junto con sus valores medios y estadísticos asociados. **116**

Tabla 17.- Valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos en plasma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de ceftiofur por vía intravenosa (IV) y por vía subcutánea (SC1), y de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2). **117**

Tabla 18.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **119**

Tabla 19.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a cabras. **120**

Tabla 20.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **120**

Tabla 21.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía subcutánea (SC1) y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **121**

Tabla 22.- Parámetros descriptores de la absorción extravascular obtenidos tras deconvolución numérica para las formulaciones SC1 y SC2 a 2, 6 y 6 mg/kg, respectivamente, En todos los casos se ha tomado referencia para cada animal las curvas plasmáticas obtenidas tras las administración intravenosa de ceftiofur a 2 mg/kg. **122**

Tabla 23. CMI y CPM de Ceftiofur frente a dos cepas de *M. haemolytica* obtenidas de cabras con neumonía. **130**

Tabla 24. Valores de T>CMI y T>CPM (h) para *M. haemolytica* obtenidos tras la administración intravenosa y subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg. **131**

Tabla 25. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CMI para la cepa 1 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días. **136**

Tabla 26. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CMI para la cepa 2 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días. **137**

Tabla 27. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CMI para la cepa 2 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días. **137**

Tabla 28. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur intravenoso (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **139**

Tabla 29. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur subcutáneo (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **140**

Tabla 30. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur subcutáneo SC2 (6 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos. **141**

TABLA 31.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskall-Wallis) entre los parámetros obtenidos tras deconvolución numérica para ceftiofur tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por subcutánea (SC1), y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras. **182**

1.-INTRODUCCIÓN.

La liberación controlada de fármacos administrados por vía parenteral ha adquirido una importancia creciente en el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas. Esto se manifiesta de forma especial en la industria farmacéutica orientada a la Sanidad Animal, implicada en la generación de formulaciones de liberación controlada para algunos fármacos, tanto para animales de compañía como de producción (Matschke y cols., 2002). Resulta interesante poder administrar el medicamento con amplios intervalos, lo que supone un menor coste y un menor estrés de manejo de los animales (Sun y cols., 2002). Las ventajas potenciales de una absorción controlada son varias: se utiliza menos cantidad de fármaco, lo que reduce los efectos colaterales y la acumulación en tratamientos prolongados; se mejora la eficiencia del tratamiento, al reducir la fluctuación de las concentraciones estacionarias y al aumentar la biodisponibilidad (Longer y Robinson, 1987). Sorprendentemente, a pesar de todo esto, tan sólo se han descrito unas pocas formulaciones de liberación controlada, en particular, respecto a antibióticos, para las fluoroquinolonas: levofloxacino (Yin y cols., 2011), ciprofloxacino (Fulzele y cols., 2007, Waknis y Jonnalagadda, 2011), moxifloxacino (Cárceles y cols., 2006), difloxacino (Marín y cols., 2010; Escudero y cols., 2011), ofloxacino (Bahk y cols., 2000), enrofloxacino (Xie y cols., 2011), ferofloxacino (Dounis y cols., 1996) y Marbofloxacino (Fernández, 2013).

Cuando el fármaco se administra por vía parenteral, la absorción puede modificarse mediante la formación de complejos disociables con macromoléculas, un proceso semejante a la unión a proteínas plasmáticas. El complejo fármaco-macromolécula puede servir de reservorio en el sitio de inyección, dando lugar a una liberación controlada. Como macromoléculas se utilizan polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol o metilcelulosa (Sun y cols., 2002). También puede retardarse la absorción mediante la modificación de la viscosidad del medicamento. Así, el P407 (70% polioxietileno + 30% polixipropileno) es un polímero que presenta una baja toxicidad, buena compatibilidad con muchos fármacos y alta

capacidad de solubilización, además ha sido aprobado su uso por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos.

Este producto en solución acuosa entre 20-30% presenta la ventaja de su gelificación termo-reversible desde su forma de baja viscosidad a 4°C hasta forma de semi-gel a la temperatura corporal (37°C). Esta propiedad hace de él un excelente vehículo para la liberación controlada (Narasimhan y Pepas, 1997). La propiedad de ser poco viscoso a temperaturas inferiores a la corporal hace que se evite la aparición de dolor en el punto de inyección. Además, mediante la adición de diferentes coadyuvantes que modifiquen su viscosidad podremos obtener diferentes grados de liberación de los fármacos. Diversas sustancias pueden ser adicionadas al P407 con este fin. Entre ellas se pueden mencionar la polivinilpirrolidona (PVP), la carboximetilcelulosa y la hidroxipropil-metilcelulosa. De ellas, la carboximetilcelulosa resulta ser, frecuentemente, bien tolerada (Zhang y cols., 2002).

La importancia del ganado caprino es cada vez mayor debido a diversas causas (Vacas, 2003). Por un lado las razas lecheras dan producciones importantes sin estar sujetas a restricciones por parte de la CEE (cuotas lecheras). Estos animales sufren diversas patologías infecciosas, que necesitan tratamiento con antibióticos de amplio espectro.

Las cefalosporinas son fármacos antibacterianos semisintéticos con una excelente acción de tipo bactericida, y sólo es eficaz sobre las bacterias que se encuentran en fase de crecimiento. En función de su espectro de actividad estos antibióticos se han ido agrupando en distintas "generaciones". Entre las cefalosporinas de primera generación se pueden incluir, por ejemplo, la cefalotina, la cefazolina y la cefalexina. En el grupo de las de segunda generación están la cefoxitina, el cefaclor y el cefonicid, y en el último grupo, las de tercera generación, destacan la cefotaxima, ceftriaxona y ceftiofur.

Ceftiofur, es una cefalosporina de tercera generación, activa frente a patógenos grampositivos y gramnegativos y, como miembro del grupo de antibióticos

betalactámicos, inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana con potentes propiedades bactericidas.

El presente proyecto pretende realizar el estudio farmacocinético de ceftiofur en la especie caprina, para establecer su posible utilidad clínica en la misma y, si ello se confirma, determinar los regímenes posológicos más adecuados según la formulación empleada (dosis e intervalo de dosificación). Estos estudios podrían ser la base para su registro en esta especie, la patente de nuevas formulaciones medicamentosas y su posible aplicación en el tratamiento de patologías infecciosas.

Por todo ello, se estudiará el comportamiento farmacocinético de dos formulaciones parenterales de liberación controlada, formulación de ceftiofur en solución de P407 al 25% y formulación de ceftiofur en solución de P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%.

1.1. HIPÓTESIS DE PARTIDA.

- El gran interés de nuevas formulaciones de liberación controlada de antibióticos en Medicina veterinaria, que permitan disminuir el número de administraciones y disminuir el estrés de los animales y el coste del tratamiento, está aumentando vertiginosamente.
- La cabra es una especie cuya importancia económica se acrecienta progresivamente.
- Las patologías infecciosas tienen una alta prevalencia en el ganado caprino lechero en los países de la cuenca Mediterránea y generan grandes pérdidas económicas.
- La formulación parenteral podría optimizarse mediante formulaciones de liberación controlada, para disminuir el número de administraciones y disminuir el estrés de los animales y el coste del tratamiento.
- Estos estudios podrían facilitar el registro de estos fármacos para su uso en la mencionada especie y la patente de formulaciones controladas parenterales.

1.2. OBJETIVOS.

1. Determinación de los parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales de ceftiofur tras la administración intravenosa y subcutánea, en solución acuosa, en caprino.
2. Determinación de los parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales de ceftiofur tras su administración subcutánea en solución de P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, en caprino.
3. Determinación de la penetración en leche de ceftiofur tras su administración intravenosa, subcutánea y en solución de P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, en caprino.
3. Estudio y evaluación de la absorción *in vivo* de las formulaciones acuosa y en solución de P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, en caprino, así como de la biodisponibilidad de estas dos formulaciones extravasculares.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria, la concentración preventiva de mutantes y elaborar las curvas de letalidad de ceftiofur frente a cepas de campo de *Mannheimia haemolytica*, como bacteria tipo causante de infecciones respiratorias en la cabra, mediante estudios *in vitro* y *ex vivo*.
5. A partir de la integración de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, elegir la pauta posológica más adecuada para cada formulación y determinar la formulación más ventajosa.

1.3. IMPLICACIONES ÉTICAS O DE BIOSEGURIDAD.

El proyecto cuenta con el visto bueno del comité de bioética de la Universidad de Murcia, aunque no presenta problemas relevantes desde el punto de vista ético ya que los animales no son sacrificados y son manejados en las mismas explotaciones en las que viven.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN.

Los β -lactámicos son un grupo farmacológico que se remonta a 1928, cuando Fleming descubrió un hongo del género denominado *Penicillium* que producía una sustancia, a la que más tarde se le denominó penicilina, capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Flórez, 2014). Presentan en su molécula un anillo β -lactámico que les caracteriza y les da el nombre y se incluyen dentro de ellos las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las β -lactamasas. Los diferentes β -lactámicos se diferencian en la estructura del anillo unido al anillo β -lactámico que da lugar a configuraciones diferentes que los distingue (Figura 1).

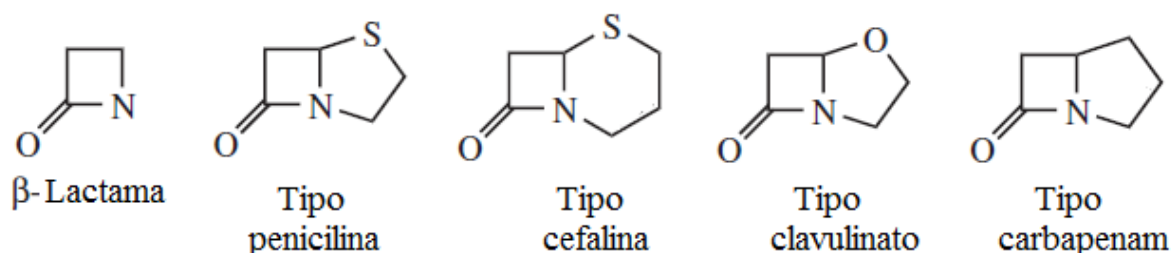


Figura 1. Anillo β -lactámico y grupos de los diversos tipos de antibióticos β -lactámicos.

La cefalosporina C fue descubierta por Giuseppe Brotzu en 1948, profesor del Instituto de Cagliari en la isla de Cerdeña, que aisló un hongo del agua del mar en una zona donde desembocaban aguas residuales. Este hongo fue inicialmente identificado como *Cephalosporium acremonium* y más tarde fue reclasificado como *Acremonium chrysogenum*, para finalmente volver a reclasificarlo como *Acremonium strictum* (Onions y Brady, 1987). A partir de este hongo obtuvo material activo frente a *Staphylococcus aureus*. Del *Cephalosporium* se obtuvieron las cefalosporinas C, N y P, siendo la C la base de las nuevas cefalosporinas.

La estructura química de la cefalosporina C fue propuesta por primera vez por Abraham y Newton en 1961 y confirmada por análisis de rayos-X por Hodgkin y Maslen (1961). El compuesto consta de un anillo dihidrotiazínico de 6 miembros, a diferencia de las penicilinas que poseen un anillo tiazolidínico de 5 miembros que da lugar al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). En el caso de las cefalosporinas el anillo dihidrotiazínico está fusionado al anillo β -lactámico dando como resultado el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), llamado también grupo "cefem". La cefalosporina C tiene unida, mediante un enlace amido, al C7 una cadena lateral alifática (d-aminoadipil) y en el C3 tiene unido un éster metílico del ácido acético (Giguére, 2006). Dada la inestabilidad química de esta cefalosporina, se desarrollaron una serie de modificaciones en la cefalosporina C, sobre todo modificando los grupos unidos al C3 y C7 del grupo "cefem", dando lugar a las cefalosporinas semi-sintéticas. Estos nuevos derivados cefalosporánicos incrementan su actividad antibiótica frente a las bacterias y también su estabilidad a la hidrólisis ácida en el estómago lo que les permite ser administrados oralmente.

Para la síntesis de la mayoría de la cefalosporinas semi-sintéticas se parte de un núcleo 7 amino-cefalosporánico (7-ACA) o 7 aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) cuya única diferencia está en el C3 (Figura 1). La combinación de estos dos núcleos con diferentes modificaciones en sus respectivos carbonos 3 y 7 permite obtener una gama muy amplia de derivados cefalosporánicos con actividad frente a diferentes microorganismos, generando un espectro muy amplio que permite combatir a un número muy grande de agentes infecciosos.

2.1.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA.

Las cefalosporinas están formadas por la unión de un anillo β -lactámico con un anillo dihidrotiazidínico de seis componentes, formando así el núcleo fundamental de las cefalosporinas, el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), biológicamente activo. A

este núcleo (cefem) se unen dos cadenas laterales que modifican la actividad antibacteriana y las características farmacocinéticas (Figura 2). Las variaciones introducidas en C7 del 7-ACA modifican la actividad antibacteriana, la sustitución en posición 3 del anillo dihidrotiazínico origina modificaciones de carácter farmacocinético, y la presencia del grupo metiltiotetrazol en esta posición está relacionado con efectos adversos concretos: alteraciones de la coagulación e intolerancia al alcohol. Las moléculas con un grupo metoxi en posición 7 del 7-ACA constituyen el grupo de las cefamicinas (Flórez, 2014).

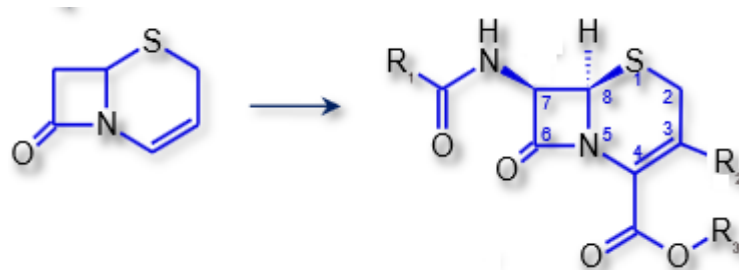


Figura 2.- Ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y núcleo básico de las cefalosporinas.

2.1.2.- CLASIFICACIÓN.

Existen distintos tipos de clasificaciones para las cefalosporinas. La clasificación de carácter biológico de O'Callaghan (1979) subdivide a las cefalosporinas en 7 grupos en base a su metabolismo y estabilidad a la degradación por β -lactamasas. Otra clasificación de carácter químico clasifica las cefalosporinas de acuerdo a los sustituyentes presentes en el carbono de la cadena lateral de C7, dando cuatro grupos: cefalosporinas sustituidas y no sustituidas a este nivel; α -amino cefalosporinas y aril-oxi-imino cefalosporinas. Otra clasificación de carácter farmacocinético, de acuerdo al tiempo de semivida en la especie humana y aplicada fundamentalmente a las cefalosporinas de uso parenteral, dispone las cefalosporinas en tres grupos, incluyéndose en el grupo 1 las cefalosporinas de vidas medias menores de 1 hora

(cefalotina, cefradina, cefapirina, cefoxitina); en el grupo 2 las de vidas medias entre 1 y 3 horas (cefazolina, cefmetazol, cefuroxima, cefotaxima, ceftioxima, moxalactam, cefmenoxima, cefoperazona, ceftazidima, cefpiroma, cefepime) y en el grupo 3 aquellas cefalosporinas con tiempos de vida media mayores a 3 horas (cefpiramide, ceftriaxona, cefodizima) (Karchmer, 2000). Además, dentro de cada uno de estos grupos se realiza una subdivisión en base a la vía de eliminación principal (renal y biliar). Otra clasificación de carácter microbiológico, elaborada por J.D. Williams, agrupa las cefalosporinas en base a su espectro antibacteriano, su actividad sobre bacterias grampositivas, gramnegativas, *Pseudomonas aeruginosa* y anaerobias. El grupo I incluye las cefalosporinas de mayor actividad sobre grampositivos (cefradina, cefradoxilo, cefalexina, cefalotina); el grupo II, a cefalosporinas con mayor actividad sobre gramnegativos (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftioxima); el grupo III a las que poseen actividad sobre *P. aeruginosa* (ceftazidima, cefoperazona) y el grupo IV a las que presentan actividad sobre bacterias anaerobias (cefoxitina, cefotetan, moxalactam) (Mella, 2001).

La clasificación más utilizada, desde una perspectiva clínica, agrupa a las cefalosporinas en generaciones (en negrita se indican las cefalosporinas de uso veterinario), de acuerdo al desarrollo histórico y algunas características microbiológicas y estructurales en común (Mella, 2001):

1. Primera generación:

- a. Oral: **Cefadroxilo** (uso veterinario en perro y gato), **cefalexina** (uso veterinario en perro y gato e intramamario en bovino), Cefradina, cefacetil, cefaloglycin, **cefalonium** (uso veterinario intramamario en bovino) y cefaloridina.
- b. Parenteral: Cefalotina, cefazolina, **cefapirina** (uso veterinario, intramamario e intrauterino en bovino), cefradina, cefaloridina, cefatrizina, cefazaflur, cefazedona, cefroxadine y ceftazol.

2. Segunda generación:
 - a. Oral: Cefaclor, cefuroxima axetilo, cefprozil y loracarbef.
 - b. Parenteral: Cefonicida, cefoxitina, cefuroxima, cefamandol, cefmetazol, cefotetan, cefamicina, cefoxitina, cefmetazol, cefminox, cefotetan, cefbuperazona y cefuzonam.
3. Tercera generación:
 - a. Oral: Cefixima, cefpodoxima proxetilo, ceftibuteno, cefditoreno, cefetamet, cefdinir y latamoxef o moxalactam.
 - b. Parenteral: Cefminox, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, **cefoperazona** (uso veterinario intramamario en bovino), ceftizoxima, moxalactam, cefpiroma, cefodizima, cefmenoxima, cefsulodina, **ceftiofur** (uso veterinario en porcino y bovino), cefpodoxima, cefcapene, cefdaloxima, cefovecin, cefpimizol, cefteram y ceftiolene.
4. Cuarta generación (Parenteral): Cefepima, cefaclidina, cefoselis, cefelidina, cefluprenam, ceftazopran, cefpirome, **cefquinoma** (uso veterinario en equino, porcino y bovino) y flomoxef.
5. Quinta generación (Parenteral): Ceftarolina y ceftobiprol.

Cada generación presenta una serie de características:

Las **cefalosporinas de primera generación** presentan buena actividad sobre cocos grampositivos, incluyendo *Corynebacteria*, *Streptococci* y *Staphylococci*, particularmente *Staphylococcus aureus* (Papich, 1984) sensible a meticilina y *Staphylococcus intermedius* (Frank y Kunkle, 1993), *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, carecen de actividad contra *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis* y

neumococos resistentes a penicilina. También presentan actividad sobre algunos bacilos gramnegativos, como *Escherichia coli* (Papich, 1984, Rosin y cols., 1993), *Klebsiella spp.* (*K. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* no productor de β -lactamasas (Papich, 1984), *Actinobacillus*, *Pasteurella Moraxella catarrhalis*. No poseen actividad sobre, *Actinobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus indol-positivo* y *Pseudomonas* (Prescott y Baggot, 1993). Además, no son útiles para el tratamiento de infecciones producidas por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* Numerosas bacterias anaerobias son susceptibles a estos antibióticos, con la excepción de *Bacteroides* productor de β -lactamasas y *Clostridium difficile* (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs-Antibiotics, 2003).

Atendiendo a sus características farmacocinéticas, las cefalosporinas de primera generación pueden administrarse por vía oral y parenteral, según el compuesto, presentan un tiempo de vida media o semivida ($t_{1/2}$) corto (aunque cefazolina y cefadroxilo tienen semividas más prolongadas que el resto), atraviesan débilmente la barrera hematoencefálica (BHE) con bajos niveles en líquido cefalorraquídeo (LCR) y se excretan por vía urinaria. Son útiles en el tratamiento de infecciones urinarias por especies sensibles (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas, 2002).

Las **cefalosporinas de segunda generación** presentan una eficacia semejante o menor que las de primera generación sobre bacterias grampositivas, sobre todo frente a *S. aureus* y *S. intermedius*. Sin embargo, tienen una mayor cobertura frente a bacterias gramnegativas que las de primera generación, siendo más activas sobre *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Proteus* (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs-Antibiotics, 2003). Su actividad se extiende sobre *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En esta generación de cefalosporinas, también se incluyen otras moléculas que técnicamente corresponden a cefamicina y carbacefems: (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas, 2002):

- Cefamicinas: Presentan un grupo metoxi en posición 7 del 7-ACA (son 7-alfa-metoxi-cefalosporinas). Poseen actividad sobre *Bacteroides fragilis* y otras bacterias anaerobias (Papich, 1987). Las cefamicinas son una familia de antibióticos producidos por diversas especies de *Streptomyces*. Se han aislado las cefamicinas A, B y C. La cefoxitina es la sal sódica de un antibiótico semisintético derivado de la cefamicina C (R=NH₂). Dentro del subgrupo de las cefamicinas se encuentran cefoxitina, cefmetazol, cefminox, cefotetan, cefbuperazona. La cefoxitina tiene un grupo tienil igual que la cefalotina y la cefaloridina, a las que se parece por su espectro de actividad. Estudios clínicos sugieren que la cefoxitina puede ser útil en el tratamiento de infecciones graves, en particular de vías biliares y renales y de cavidad peritoneal (Bowman y Rand, 1980).
- Carbacefems: El azufre del anillo dihidrotiazínico del núcleo 7-ACA o grupo cefem está sustituido por un carbono (carba) de un grupo metileno (CH₂). Dentro de este subgrupo se incluye loracarbef.

Las cefalosporinas de segunda generación carecen de actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus* (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs-Antibiotics, 2003). Son menos activas que las cefalosporinas de primera generación sobre cepas de *S. aureus* sensibles a oxacilina, con la excepción de cefamandol. Las cefalosporinas de segunda generación pueden administrarse por vía oral o parenteral según el compuesto, tienen una semivida corta, atraviesan la BHE mejor que las de primera generación, sin embargo, no se consideran agentes de elección en el tratamiento de meningitis bacteriana aguda, y se eliminan vía renal (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas, 2002).

Las cefalosporinas de segunda generación pueden ser útiles en el tratamiento de otitis, sinusitis y de infecciones del tracto respiratorio. Generalmente se reservan para el tratamiento de infecciones que son resistentes a las cefalosporinas de primera generación.

Las **cefalosporinas de tercera generación** representan uno de los grupos de antibióticos de mayor uso actualmente. En su estructura química presentan un anillo 2-aminotiazolil como cadena lateral en C-7 del núcleo 7-ACA. Moxalactam, cefotaxima, ceftizoxima, cefmenoxima, ceftriaxona y ceftiofur son aminotiazolil-iminometoxi-cefalosporinas. Poseen un amplio espectro de actividad, siendo más eficaces *in vitro* contra bacilos gramnegativos y cocos grampositivos, presentando una elevada actividad contra *Enterobacteriaceae* (excepto sobre cepas hiperproductoras de cefalosporinasas y/o de β -lactamasas de espectro extendido (BLEA o extended-spectrum β -lactamase), *Serratia marcescens*, *H. influenzae* (incluyendo cepas productoras de β -lactamasas), *M. catarrhalis*, *Neisseria spp.*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. Ceftazidima y cefoperazona poseen actividad frente a *P. aeruginosa*. Las cefalosporinas de tercera generación tienen poca actividad frente a la mayoría de cepas de *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *P. aeruginosa* (a excepción de ceftazidima y cefoperazona), y las bacterias anaerobias (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs-Antibiotics, 2003). Existen cefalosporinas de tercera generación de administración oral y parenteral según la molécula. Algunos de los componentes de esta generación, como ceftriaxona, presentan una semivida prolongada; la cefotaxima se metaboliza a una forma biológicamente activa, la desacetilcefotaxima. Alcanzan concentraciones eficaces en una amplia variedad de tejidos y parénquimas, entre ellos sangre, orina, bilis (particularmente cefoperazona y ceftriaxona), pulmones, líquido peritoneal y meninges (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas, 2002).

Las cefalosporinas de tercera generación son útiles en el tratamiento de la otitis media, de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, infecciones del tracto urinario (cefixima, cefpodoxima y cefdinir) y de la meningitis bacteriana aguda (ceftriaxona y cefotaxima), si bien, la aparición creciente de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y cefalosporinas ha limitado su uso como monoterapia empírica para el tratamiento de infecciones meníngeas en algunos centros (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas, 2002).

Las **cefalosporinas de cuarta generación** presentan en su estructura química un grupo metoxi-imino-aminotiazolil en R1 del núcleo 7-ACA, excepto cefclidin (previamente E 1040) que presenta un grupo aminotiadiazolil y un nitrógeno cuaternario en R2. La asociación de una carga neta positiva con una carga negativa en el núcleo 7-ACA convierte a estas cefalosporinas en moléculas zwitteriónicas, es decir, moléculas con un balance entre sus cargas positivas y negativas en los rangos de pH encontrados *in vivo*. Esta característica químico-estructural proporciona a estas cefalosporinas una capacidad de penetración a través de las porinas (de manera selectiva a través de la porina Omp F), superior a las de tercera generación, lo que le permite alcanzar altas concentraciones en el espacio periplásmico de los bacilos gramnegativos. Además presentan una gran estabilidad contra β -lactamasas mediadas por cromosomas, plásmidos bacterianos y afinidad por las proteínas de unión a penicilinas (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas 2002).

Poseen una actividad superior con respecto a las cefalosporinas de tercera generación frente a bacilos gramnegativos multirresistentes (*Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia* y cepas de *Proteus* indol negativo hiperproductoras de cefalosporinasas, y cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEA) y equivalente frente cepas de bacterias gramnegativos susceptibles y *S. pneumoniae*. Presentan una actividad antibacteriana sobre *P. aeruginosa* comparable, pero no superior, a la de ceftazidima, y tienen mejor actividad contra algunos grampositivos en comparación con las cefalosporinas de tercera generación (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas 2002).

Cefalosporinas de quinta generación. La ceftarolina posee un metabolito activo cuyo espectro de actividad *in vitro* es similar a ceftriaxona pero con una mejor actividad frente a grampositivos. Ceftarolina tiene una mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilinas tipo 2^a (PBP2a) de los estafilococos oxacilin-resistentes y tiene actividad también contra *S. aureus* meticilin-resistente (MRSA) y contra *S. aureus* con resistencia intermedia y heterogénea a vancomicina (VISA). También presenta actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* resistente a la

penicilina o ceftriaxona. La ceftarolina no es activa contra *Enterobacteriaceae* sobreproductoras de AmpC o productoras de BLEA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o *Bacteroides fragilis* (Sader y cols., 2015).

2.2.- RELACIÓN ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD.

Las cefalosporinas son agentes antibacterianos que poseen un anillo β -lactámico unido a un anillo dihidrotiazínico formando así el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), el núcleo fundamental de las cefalosporinas.

Características del núcleo 7-ACA (Flórez, 2014):

- Presenta resistencia a diversas penicilinasas, lo que proporciona un amplio espectro de actividad a las cefalosporinas.
- Presencia constante de un grupo carboxílico en C4 y una cadena lateral β -acilamínica en C7 (-R1); sin embargo, este núcleo también permite la adición de distintos sustituyentes en C3 (-R2).

Las cefalosporinas poseen una actividad bactericida que depende del inóculo bacteriano, de la fase de crecimiento bacteriana y del tiempo, obteniendo su máximo efecto bactericida cuando en una proporción importante del intervalo interdosis la concentración plasmática del antibacteriano se encuentra por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Al ácido 7-aminocefalosporánico le han unido por semisíntesis diversos grupos químicos especialmente en los carbonos 7 y 3, o radicales R1 y R2 respectivamente, que conforman sus cadenas laterales (Figura 2).

Sustitución a nivel de R1. En general, las variaciones a nivel de R1 (C7) modifican la actividad antibacteriana. Dichas variaciones producen habitualmente moléculas con mayor afinidad por proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), particularmente de bacilos gramnegativos, y mayor estabilidad frente a β -lactamasas, obteniendo compuestos con mayor espectro de actividad y potencia. Así, el grupo 2-

aminotiazolil en el carbono 7 (R1), presente en cefotiam, permitió el desarrollo de moléculas con elevada afinidad sobre PBP de bacterias gramnegativas, particularmente por PBP 1A y PBP 3, pero inestables frente a β -lactamasas. Posteriormente se desarrollaron nuevas moléculas resistentes a la degradación por β -lactamasas manteniendo la capacidad de unión a PBP. La introducción del radical metoxi-imino sobre el carbono α originó las metoxi-iminocefalosporinas, que se caracterizan por su estabilidad frente a β -lactamasas. Las cefalosporinas de tercera generación, incorporaron simultáneamente el grupo aminotiazolil y el radical metoxi-imino, consiguiendo una elevada actividad de estos compuestos sobre *Enterobacteriaceae* (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas 2002).

Sustitución a nivel de R2. Las variaciones a nivel de R2 originan modificaciones en las propiedades farmacocinéticas de estas moléculas. Los compuestos con radical acetiloximetil, (como cefalotina y cefotaxima) presentan una vida media muy corta, siendo rápidamente metabolizados en el organismo por esterasas plasmáticas y hepáticas, dando origen a compuestos desacetilados que, en general, son menos activos como anti-bacterianos que la molécula original. Además, la presencia de sustituyentes pequeños y exentos de carga en R2 es una característica general de las cefalosporinas de primera generación de uso oral; así cefalexina, cefradina y cefadroxilo, disponen de un grupo metilo a este nivel, mientras que cefaclor presenta un cloro en R2. Las cefalosporinas de uso parenteral tienden a presentar semividas más prolongadas en relación a la presencia de radicales ácidos y de mayor tamaño en R2, como en ceftriaxona que presenta un anillo heterocíclico de carácter ácido (1,2,5,6- tetrahidro- 2-metil- 5,6-dioxo- 1,2,4- triazin -3-il) que permite explicar niveles plasmáticos más elevados y semividas más prolongadas que el resto de las aminotiazolil metoxi-imino cefalosporinas. La cefazolina (cefalosporina con un anillo heterocíclico en R2) presenta concentraciones plasmáticas más elevadas y semivida más prolongada que cefalotina (acetiloximetilo cefalosporina). El radical N-metiltetrazol, presente en moxalactam, cefamandol, cefoperazona, cefmenoxima, cefpiramida, cefmetazol, cefotetan y cefbuperazona, explica la aparición de efectos

adversos con el uso de estas moléculas, principalmente de tipo hematológico con prolongación del tiempo de protrombina, por alteración en la síntesis de vitamina K en el intestino, y efecto de tipo *disulfiram*, por inhibición del metabolismo del alcohol. El radical 3' mercaptotiazida está presente en cefodizima, otorgándole parámetros farmacocinéticos más favorables y una peculiar actividad inmunomoduladora (Flórez, 2014; Mella, 2001; Rivas 2002).

2.3.- MECANISMO DE ACCIÓN.

La acción de los β -lactámicos se desarrolla mediante la inhibición de las etapas finales de la síntesis del peptidoglicano o mureína que es un polímero esencial en la pared celular (Figura 3) de casi todas las bacterias (las clamidias carecen de peptidoglicano y son, por lo tanto, resistentes a los β -lactámicos).

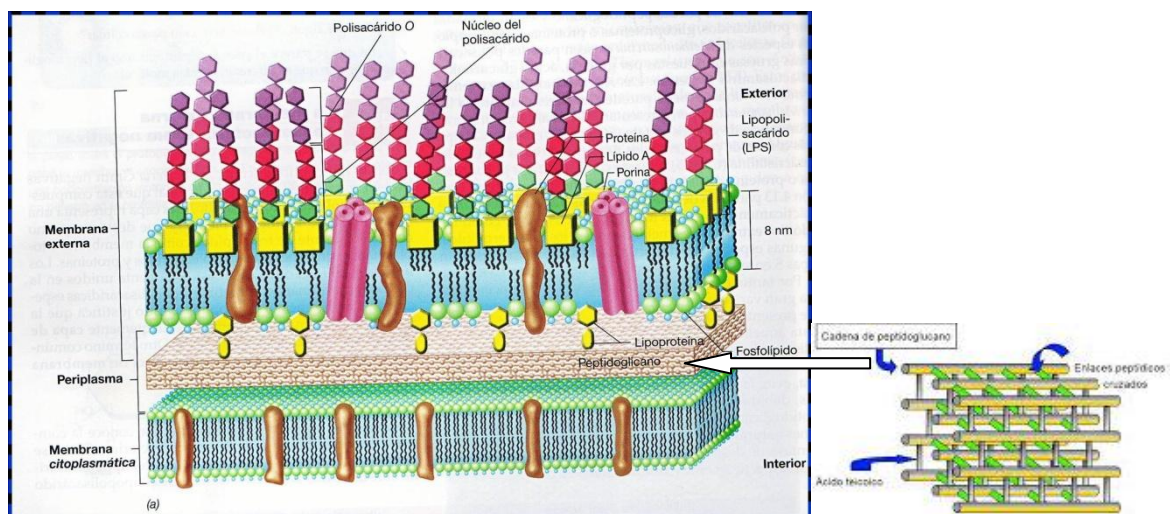


Figura 3. Pared celular y membrana citoplasmática de *E. coli*.

El peptidoglicano es un polímero de naturaleza glucopeptídica cuya estructura está bastante conservada en todas las bacterias, aunque haya cambios en la composición química y la naturaleza de los monómeros constituyentes entre bacterias grampositivas y gramnegativas (Flórez, 2014). El peptidoglicano está formado por

cadena en las que se alternan N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos mediante enlaces β -1-4 glucosídicos (Figura 4).

Estas cadenas de heteropolímeros son rectas y no ramificadas, constituyendo la estructura básica (Schlegel, 1997). Generalmente el grupo ácido del NAM está esterificado por el pentapéptido L-ala-D-glu-DAP-(ácido diaminopimélico)-D-ala-D-ala en el caso de las bacterias gramnegativas. En las bacterias grampositivas el pentapéptido es L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala.

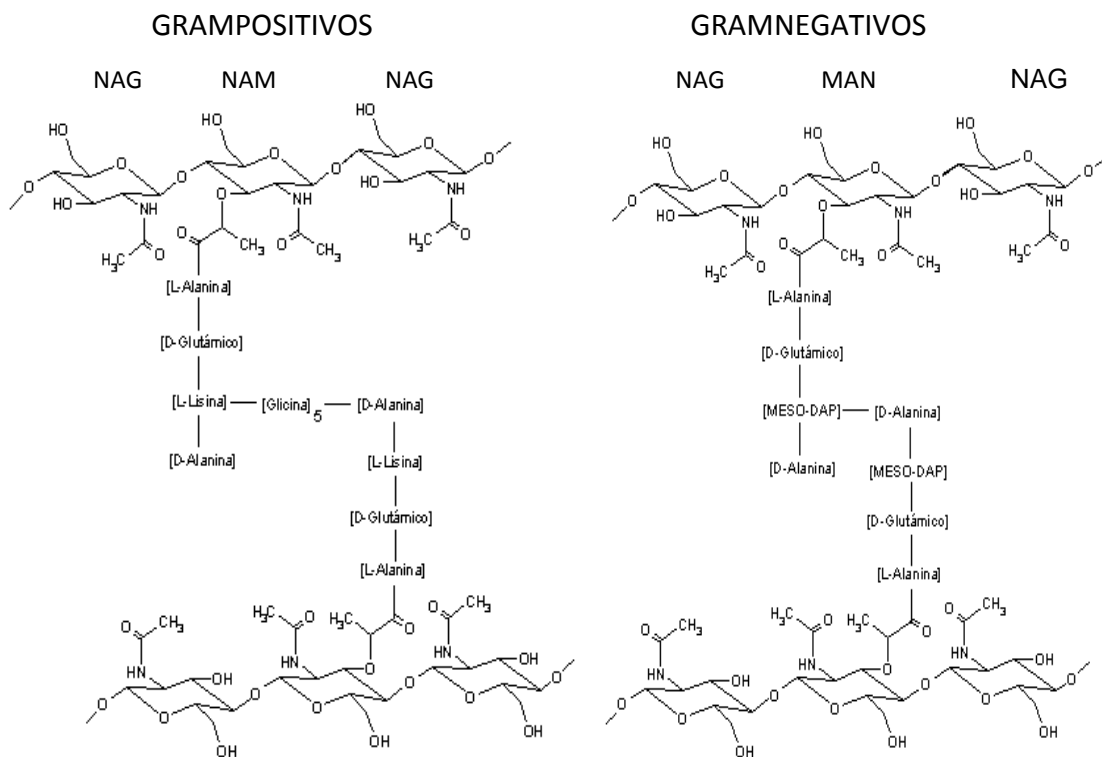


Figura 4.- Estructura de las cadenas de N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM).

Los pentapéptidos están unidos, mediante enlaces peptídicos (Figura 5), con otros pentapéptidos, de forma que el último péptido de D-ala es liberado. En las bacterias gramnegativas el enlace peptídico es directo entre el D-Ala en 4ª posición de una cadena con el m-DAP de la cadena siguiente, liberándose el D-Ala en 5ª posición (Figura 5-A). En las bacterias grampositivas (Figura 5-B), el enlace que se forma es

mediante unión indirecta a través de una pentapéptido de glicina entre la D-Ala en 4ª posición y L-Lys de la cadena siguiente (Murray, 2006).

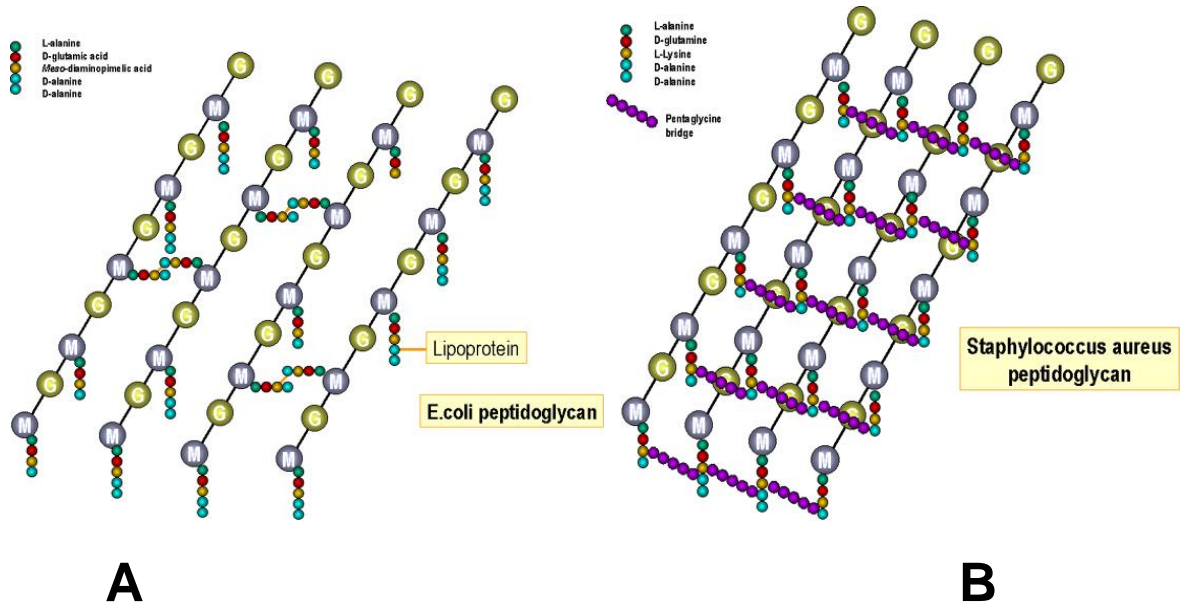


Figura 5. Estructura peptidoglicano en gramnegativos (A) y grampositivos (B).

La síntesis de peptidoglicano ocurre en 4 fases con distintas localizaciones (Figura 6). La 1ª fase tiene lugar en el citoplasma donde el UDP-NAM se obtiene a partir del UDP-NAG (por la enzima fosfoenol piruvato) y los 5 aminoácidos se unen de forma secuencial al UDP-NAM excepto los dos últimos que son unidos en forma de dipéptido (D-Ala-D-Ala). La 2ª fase ocurre en el interior de la membrana citoplasmática, el UDP-NAM unido al pentapéptido se une a un lípido llamado bactoprenol que actúa como transportador y se forma la unión $\text{NAM}_{\text{pentapéptido}}\text{-NAG}$ y el bactoprenol difunde a la cara externa de la membrana. La 3ª fase es la fase de polimerización, donde la cadena de peptidoglicano crece por acción de la enzima transglucolasa que formará los enlaces glucosídicos B1-4. La 4ª, y última fase, es la formación de enlaces cruzados entre las cadenas lineales del peptidoglicano. Estos enlaces se establecen entre los aminoácidos del pentapéptido, concretamente entre el aminoácido en posición 3 (que siempre es dibásico y tiene un grupo amino libre) y el residuo D-ala en posición 4. Esto hace que se desplace el resto de D-ala en posición 5. Las enzimas que catalizan esta etapa se llaman transpeptidasas. No todos los

pentapéptidos participan en reacciones de entrecruzamiento. Una segunda enzima, la D-ala-carboxipeptidasa, elimina los restos D-ala terminales de cualquier pentapéptido que no se halle comprometido en el entrecruzamiento (Flórez, 2014; Murray, 2006).

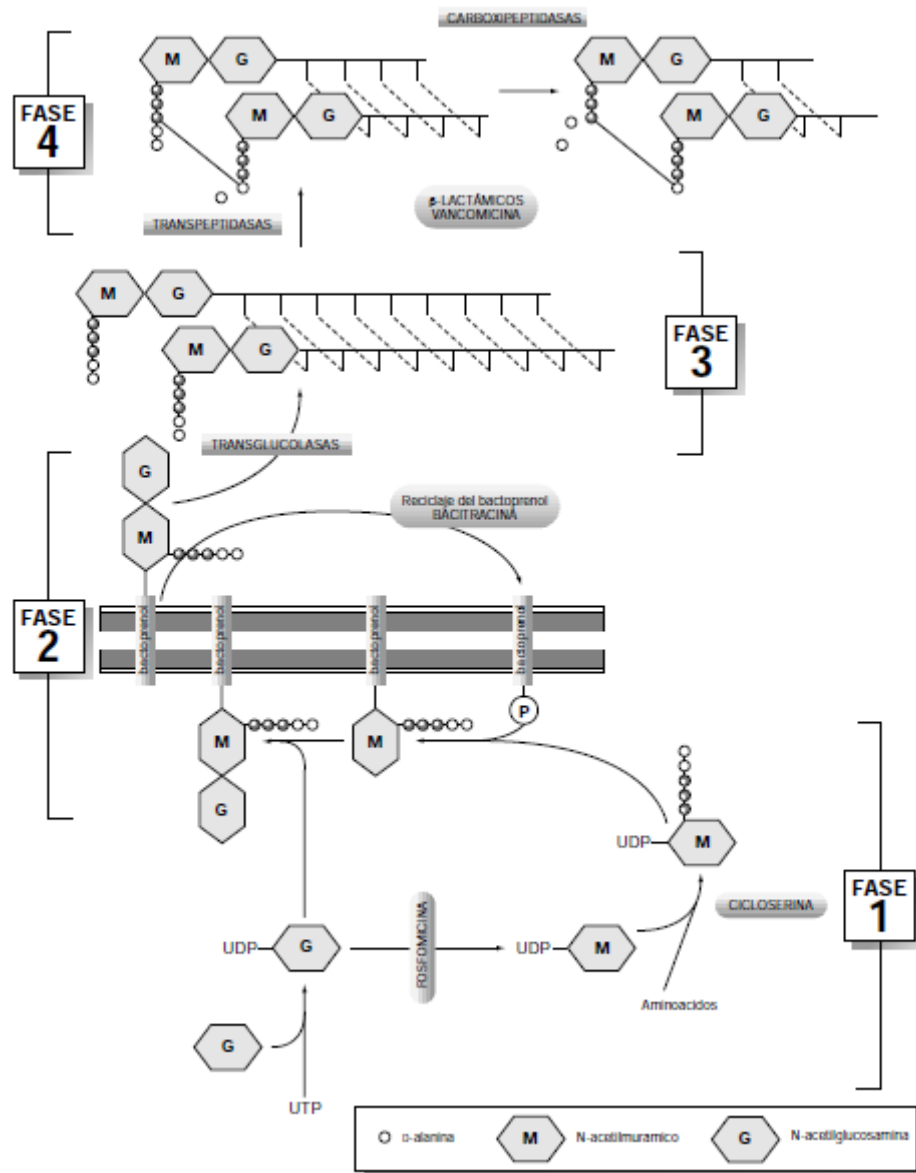


Figura 6.- Síntesis peptidoglicano: fases y localización de las mismas.

Existen diferencias notables entre la estructura de la pared bacteriana en organismos grampositivos y gramnegativos (Figura 7). La más notable es la presencia

en los gramnegativos de una segunda membrana, la membrana externa, creándose un espacio entre ambas, el espacio periplásmico, en el que se encuentra el peptidoglicano. El peptidoglicano en las bacterias gramnegativas se ve al microscopio electrónico como una capa fina, posiblemente constituida por una única molécula bidimensional, que conserva la forma de la bacteria, y a la que normalmente se denomina «sáculo de mureína». En las grampositivas no existe la membrana externa y el peptidoglicano aparece como una capa más gruesa (150 a 500 Å), lo que posiblemente indica mayor incidencia de malla tridimensional en ella. (Flórez, 2014; Murray, 2006).

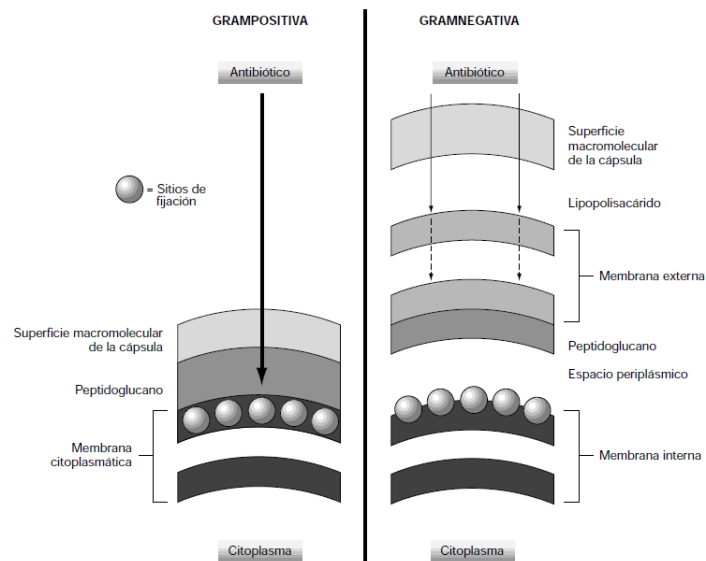


Figura 7.- Estructura de pared bacteriana de grampositivas y gramnegativas.

Las cefalosporinas (así como el resto de los β -lactámicos) inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al impedir la biosíntesis del peptidoglicano, por competición con las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas encargadas de la formación de los puentes entre los pentapéptidos. Al contrario que ocurre con el sustrato natural, los β -lactámicos se unen a la transglucolasa formando un enlace

covalente con una serina de su centro activo, lo que produce la inactivación irreversible de la enzima (Dámaso, 1990; Flórez, 2014).

Las transpeptidasas y carboxipeptidasas que reconocen como sustratos a las cefalosporinas se denominan “proteínas fijadoras de penicilina” (PBP/PFP). Esta unión es debida a la similitud estructural de las cefalosporinas por los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) que une las moléculas de peptidoglicano de la pared bacteriana. Se han descrito distintos tipos, entre los más importantes cabe destacar las PBP1, PBP2 y PBP3, ya que se consideran necesarias para la formación de la pared celular. La PBP1a y la 1b presentan actividad transglicosidasa y su inhibición trae consigo la detención del crecimiento celular y la lisis de la bacteria. La PBP2, también llamado factor de conformación, confiere forma alargada a la célula y su inhibición origina formas esféricas u ovoides a la bacteria. La PBP3 es llamada factor de segmentación y su papel consiste en la formación de septos y su inhibición trae consigo el alargamiento incontrolado de la celular y muerte (Dámaso 1990). En líneas generales los β -lactámicos son afines a las PBP1, -2 o -3, y en especial para cefalosporinas los grupos de PBP2 y PBP3 (Riviere y Papich, 2009).

Dado que las PBP se encuentran en la parte externa de la membrana celular, la actividad antibacteriana dependerá de la accesibilidad de la cefalosporina a la PBP. En las bacterias grampositivas su acceso es más fácil, pero en las bacterias gramnegativas, que poseen una membrana externa, para que la cefalosporina alcance su diana debe hacerlo a través de las porinas (canales proteicos para la entrada de nutrientes que permiten la difusión a través de la membrana de moléculas hidrófilas de menos de 700 Da) de la membrana externa (Murray, 2006).

Para que las cefalosporinas tengan actividad bactericida, es necesario que las bacterias estén creciendo activamente. En estas condiciones, la falta de transpeptidación y la actividad normal de las mureín-hidrolasas (autolisinas), hace que la mureína se debilite y en consecuencia la bacteria se destruye por lisis osmótica. Si

las bacterias no están en crecimiento, son insensibles a la acción de las penicilinas. En una población bacteriana susceptible a los β -lactámicos siempre existen algunas células que por diferentes razones no son lisadas. Este fenómeno se denomina tolerancia y puede producir el fracaso del tratamiento (Flórez, 2014).

En resumen, el mecanismo de acción de las cefalosporinas es la inhibición de la síntesis del peptidoglicano por inhibición de la actividad de las transpeptidasas y carboxipeptidasas por unión a las PBP. Por todo esto, la actividad antibacteriana dependerá de tres factores: accesibilidad a las PBP, afinidad por las PBP y resistencias bacterianas.

Ceftiofur presenta un mecanismo de acción, alterando la síntesis de la pared bacteriana con una acción bactericida tiempo-dependiente. La unión a la pared bacteriana es debido a la similitud estructural de ceftiofur a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido que une las moléculas del peptidoglicano. Además, induce activación de autolisinas bacterianas que destruyen el peptidoglicano (Mella, 2001).

2.4.- INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA.

Existen múltiples factores que pueden incidir directa o indirectamente en el éxito terapéutico de los antibióticos, y que clásicamente se agrupan en una tríada conformada por la interacción entre el agente infeccioso (microorganismo), el fármaco y las características del sujeto infectado y que es tratado (Davis y cols., 1968).

Por tanto, para poder evaluar la eficacia de los antibacterianos, actualmente se aceptan una serie de principios farmacocinéticos y farmacodinámicos que ayudan a predecir su potencia y el régimen de administración más adecuado y que tienen en consideración el factor concentración y el factor tiempo (Quintiliani, 2004). Así, los

antibacterianos pueden dividirse principalmente en dos grupos (Craig, 1998; Andes y Craig, 2002):

1. Aquellos que producen la muerte bacteriana de forma dependiente del tiempo de exposición.
2. Aquellos en los que la actividad es dependiente de la concentración alcanzada en el lugar de acción.

Los antimicrobianos que actúan sobre la pared celular como β -lactámicos y vancomicina tienen un mecanismo de acción predominantemente tiempo-dependiente, es decir la actividad bactericida es máxima con $C_{m\acute{a}x}$ 4 veces sobre la CMI y no aumenta con concentraciones mayores, con lo que la máxima eficacia se asocia a la obtención de tiempos prolongados de concentración del antibacteriano 4 veces sobre la CMI (Figura 8).

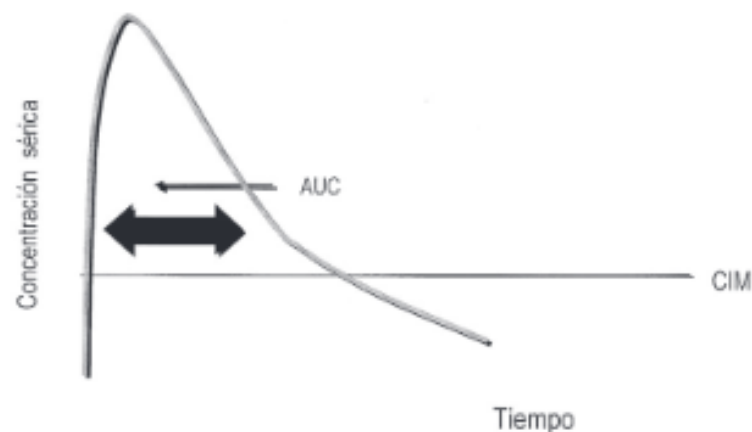


Figura 8. Farmacodinamia de antibacterianos con acción tiempo-dependiente. (Beltrán, 2004)

Las cefalosporinas pertenecen al grupo de antibacterianos tiempo dependiente. Dado que, en general, presentan semividas cortas, el objetivo farmacodinámico al utilizar estos antimicrobianos es por lo tanto lograr tiempos sobre

la CMI ($T > CMI$) prolongados, lo que también se asocia a mayores valores de la ratio AUC/CMI . En general se recomienda el uso de dosis fraccionadas ajustadas a la vida media de cada antibacteriano (Beltrán, 2004). Este principio general para antibacterianos activos sobre la pared celular aplica cuando se trata de bacterias muy sensibles y/o de inóculos bacterianos bajos; sin embargo, frente a inóculos altos la $C_{máx}$ adquiere importancia y la actividad bactericida máxima puede no alcanzarse aún con $C_{máx}/CMI$ de 128 veces (Onyeji y cols., 1994; Beltrán, 2004; Mckellar y cols., 2004).

Los objetivos farmacodinámicos más evaluados para las distintas familias de antimicrobianos se muestran en la Figura 9.

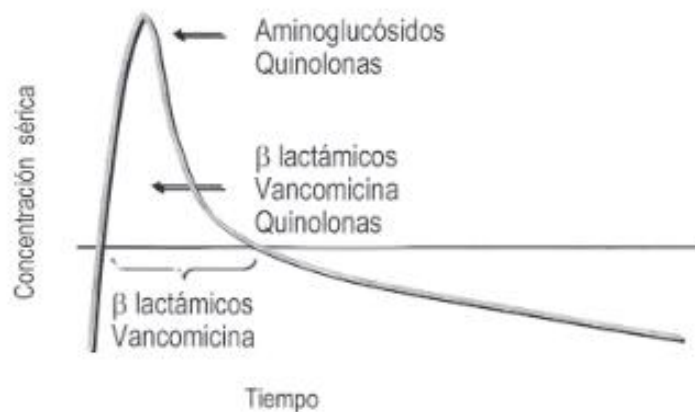


Figura 9. Objetivos farmacodinámicos más evaluados para las distintas familias de antimicrobianos.

La ratio $T > CMI$ puede ser expresado en unidades de tiempo (horas) o en porcentajes del tiempo entre administraciones en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la CMI (Toutain y cols., 2002). Por ejemplo, para la mayoría de las infecciones, se considera suficiente un tiempo en el que las concentraciones son mayores que la CMI superior al 40 o al 50% del intervalo entre dosis. Para penicilinas, cefalosporinas y macrólidos este periodo de tiempo necesario para lograr la eficacia bacteriana es del 60%-70% del intervalo posológico (Craig, 1998;

McKellar y cols., 2004). Sin embargo, en sujetos neutropénicos, con meningitis o con microorganismos intrínsecamente resistentes (como *Pseudomonas aeruginosa*) se recomiendan valores superiores al 60% e incluso cercanos al 100%. Para Toutain y cols. (2002), para las penicilinas y cefalosporinas, esta ratio debe de ser superior al 50% para garantizar el éxito terapéutico, y del 80% como valor óptimo. En los β -lactámicos, no se recomienda superar un T>CMI superior al 80% ya que, al ser bactericidas en fase de crecimiento, las bacterias deben poder reiniciar su fase de crecimiento, sin la cual el antibiótico sería ineficaz. Son, por tanto, necesarios periodos de tiempo en que las concentraciones del antibiótico sean subeficaces (subCMI) y permitan iniciar la fase de crecimiento de las bacterias que se volverán susceptibles a la segunda dosis del mismo (Odenholt, 2001; Picco y cols., 2009).

Si bien las concentraciones subCMI ocasionan alteraciones metabólicas en las bacterias, responsables de la disminución de su adherencia, patogenicidad y virulencia, volviéndolas más susceptibles a la actividad de los fagocitos (Lorian, 1975; Odenholt, 2001), no resulta conveniente alargar los periodos de tiempo de esas concentraciones subCMI, ya que las cefalosporinas tienen un efecto post-antibiótico (EPA) frente a grampositivos de tan sólo 2 h, y mucho menor frente a gramnegativos (Odenholt, 2001; Suárez y Gudíol, 2009), excepto para anaerobios gramnegativos, en cuyo caso el EPA puede llegar a las 12 horas (Aldridge, 2002).

Esta característica, propia de los antibióticos con acción preferentemente dependiente del tiempo, junto con la corta semivida de la mayoría de las cefalosporinas, condicionan su posología, lo que hace que se precise su administración varias veces al día para conseguir un T>CMI óptimo (Suárez y Gudíol, 2009).

Por tanto, la integración PK/PD es una guía para obtener estimaciones iniciales de dosis, que son *a priori* 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 los 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 plasmática de un fármaco no necesariamente refleja la capacidad de éste para penetrar en el sitio de infección o en el interior de la célula bacteriana (MacGowan y Bowker, 2002).

Dado que las cefalosporinas ejercen su acción mientras el microorganismo está en fase de crecimiento, su actividad bactericida es menor en el tratamiento de abscesos, en los que gran parte de los microorganismos pueden estar en fase quiescente (aunque también puede influir la penetración del fármaco). En infecciones con gran inóculo bacteriano, especialmente las causadas por algunos gramnegativos (el ejemplo clásico es la neumonía nosocomial por gramnegativos), el efecto de las cefalosporinas también puede ser inferior (Wright, 1999).

En la integración PK/PD hay que tener en cuenta varias limitaciones (Andes y Craig, 2002; Toutain y cols., 2002; McKellar y cols., 2004):

1. Los parámetros farmacodinámicos (por ejemplo, la CMI) se obtienen *in vitro*. Por tanto, el pH, la presencia de oxígeno y el número de microorganismos no van a ser iguales en el medio de cultivo que en el ambiente donde crece el microorganismo *in vivo*: sangre, leche, líquido extracelular e intracelular, etc. Además, se va a subestimar la duración del efecto post-antibiótico, que suele ser superior *in vivo*.
2. Los parámetros farmacocinéticos se deben obtener de la concentración en la biofase, lo cual resulta complicado. Si no existen barreras que impidan la difusión del fármaco, la concentración del fármaco libre en plasma, se aproxima a la concentración del fármaco en el espacio extracelular. Por tanto, la concentración del antibacteriano no unido a proteínas plasmáticas es el mejor predictor del éxito clínico, incluso para las infecciones en tejidos. En aquellos

fármacos con más de un 20% de unión a proteínas plasmáticas, es conveniente utilizar un factor de corrección.

2.5.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO.

Las cefalosporinas actúan específicamente sobre la pared bacteriana y presentan actividad bactericida en aquellas bacterias que están creciendo activamente. Durante los test de antimicrobianos *in vitro*, se comprobó que al retirar el medicamento existe una demora para que el microorganismo vuelva al periodo logarítmico de crecimiento, este fenómeno se denomina efecto post-antibiótico (EPA). Las cefalosporinas, al contrario que los fármacos que inhiben la síntesis proteica, no presentan efecto post-antibiótico en bacterias gramnegativas, pero si presentan un ligero efecto post-antibiótico en bacterias grampositivas (Noda y Vidal, 2010). Como ya se dijo, actúan como antibióticos tiempo dependiente, por lo que su actividad viene definida por el tiempo en el que la concentración sobrepasa la CMI ($T > CMI$), lo que también se asocia a mayores ratios de AUC/CMI (Beltrán, 2004). Se considera que la concentración debe ser superior a la CMI al menos un 40-50% del tiempo, y se considera ideal que alcance el 80% (Craig, 1998).

2.5.1.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINAS PRIMERA GENERACIÓN.

La cefalotina es la cefalosporina de primera generación más antigua y fue utilizada como el prototipo de este grupo. Cefalotina es activa contra la mayoría de cocos grampositivos (incluyendo los estafilococos productores de penicilinas), pero no tiene actividad clínica contra los enterococos, *Listeria*, estafilococos resistentes a oxacilina (Mulligan y cols., 1993), o resistente a la penicilina y neumococos (Friedland y McCracken, 1994; Tomasz, 1997; Whitney y cols., 2000).

Cefalotina es activo contra la mayoría de cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*, pero presenta poca actividad frente a otras especies de *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* y los bacilos gramnegativos no entéricos como *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cocos gramnegativos (tales como el gonococo y meningococo) y *Haemophilus influenzae* son generalmente resistentes. Cefalotina también es activa contra la mayoría de los patógenos anaerobios comunes, con algunas excepciones, como los Bacteroides, particularmente *B. fragilis* (Friedland y McCracken, 1994; Tomasz, 1997; Whitney y cols., 2000).

La cefazolina tiene un espectro de actividad similar a cefalotina. Alcanza niveles plasmáticos más altos que cefalotina, y tiene una vida media de eliminación más prolongada. La cefazolina es menos estable que cefalotina *in vitro* frente algunas penicilinasas de estafilococos; aunque su relevancia clínica no está demostrada (Sabath, 1989).

2.5.2.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINAS SEGUNDA GENERACIÓN.

Las cefalosporinas de segunda generación son algo menos activas contra cocos grampositivos que las de primera generación, pero son más activas contra bacilos gramnegativos. Esta generación de compuestos se puede dividir en dos subgrupos.

En el primer subgrupo por su importancia clínica, cabe destacara la cefuroxima es más activa que la cefazolina *in vitro* frente a cepas de *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* y algunas subespecies de *Proteus*. Sin embargo, algunos de estos microorganismos desarrollan resistencia de tipo cromosómica (Pitout y cols., 1997).

El segundo subgrupo de las cefalosporinas de segunda generación con estructura de cefamicina incluye a cefoxitina y cefotetan. Este subgrupo es activo contra la mayoría de cepas de *E. coli*, *P. mirabilis* y *Klebsiella*, como las cefalosporinas de primera generación. Los cefamicinas son bastante estables frente a muchas β -lactamasas mediadas por plásmidos, pero la actividad de este grupo contra *Enterobacter* y algunas subespecies de *Proteus* está limitada por la inducción de la cefalosporinasas cromosómicas de estas especies y la selección de mutantes (Pitout y cols., 1997).

A diferencia de las cefalosporinas de primera generación, los cefamicinas son activas contra muchas cepas de *Bacteroides*. La combinación de actividad contra bacilos aerobios facultativos y gramnegativos y *Bacteroides* ha llevado a la utilización de las cefamicinas en la profilaxis y terapia de infecciones en las cavidades abdominales y pélvicas (donde predominan estos organismos) aunque el *Bacteroides Fragilis*, presenta unas altas tasas de resistencia (Bohnen y cols., 1992; Snyderman y cols., 1996).

2.5.3.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINAS TERCERA GENERACIÓN.

Las cefalosporinas de tercera generación se caracterizan por ser estables frente a las β -lactamasas comunes de bacilos gramnegativos, y son muy activas frente a enterobacterias (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*), *Neisseria*, y *Haemophilus influenzae* (Klein y Cunha, 1995; Rivas y cols., 2002). Son el tratamiento de elección para meningitis producidas por bacterias gramnegativas. Sin embargo, algunos mutantes de enterobacterias, *Serratia* y *Citrobacter*, son resistentes a estos antibióticos (Pitout y cols., 1997).

Las cefalosporinas de tercera generación son menos activas contra la mayoría de los microorganismos grampositivos que las cefalosporinas de primera generación y son inactivas contra los enterococos, *Listeria*, estafilococos resistentes a oxacilina, y *Acinetobacter*. La cefotaxima y ceftriaxona suelen ser activas contra neumococo con sensibilidad intermedia a la penicilina, pero las cepas totalmente resistentes a la penicilina a menudo son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación también (Whitney y cols., 2000).

Algunas cefalosporinas de tercera generación, incluyendo cefotaxima y ceftriaxona, tienen poca actividad frente a *P. aeruginosa*. Sin embargo, otras como cefoperazona y ceftazidima, tienen actividad contra *P. aeruginosa*. Cefoperazona fue el primer fármaco disponible en este subgrupo, pero actualmente su uso es escaso debido a la disminución de la estabilidad a las β -lactamasas mediadas por plásmidos de bacilos gramnegativos que la hacen menos activa contra enterobacterias que otras cefalosporinas de tercera generación. La ceftazidima, es bastante estable a las β -lactamasas mediadas por plásmidos y es altamente activa contra enterobacterias, *Neisseria* y *Haemophilus influenzae*. La ceftazidima también es activa contra *P. aeruginosa* y es una terapia eficaz para las infecciones graves por *P. aeruginosa* cuando el microorganismo es resistente a las penicilinas antipseudomonas o el paciente es alérgico a la penicilina. Además, es eficaz en el tratamiento de las meningitis causadas por *P. aeruginosa*, aunque tiene poca actividad frente a microorganismos grampositivos. La ceftazidima generalmente debe administrarse en combinación con un aminoglucósido para el tratamiento de infecciones graves por *P. aeruginosa* (Mella y cols., 2001).

2.5.4.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINAS CUARTA GENERACIÓN.

Las cefalosporinas de cuarta generación se caracterizan por incorporar en su estructura un amonio cuaternario cargado positivamente unido al anillo de

dihidrotiazina, que se traduce en una mejor penetración a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y una menor afinidad para algunas beta-lactamasas producidas por bacilos gramnegativos respecto a las cefalosporinas de tercera generación (Mella y cols., 2001).

De forma general y práctica puede señalarse que estos agentes despliegan una actividad superior a la ceftriaxona y cefotaxima sobre bacilos gramnegativos multirresistentes (*Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia* y cepas de *Proteus* indol negativo hiperproductoras de cefalosporinasas y/o sobre de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y equivalente al de estos compuestos de tercera generación sobre cepas de bacterias gramnegativas susceptibles y *S. pneumoniae* (Mella y cols., 2001; Gómez y cols., 2015).

2.5.5.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINAS QUINTA GENERACION.

El ceftobiprol es una cefalosporina activa tanto frente a *Staphylococcus aureus* como estafilococos coagulasa negativos, sensibles y resistentes a meticilina, así como frente a las cepas resistentes a vancomicina (VRSA). Este compuesto se une e inhibe a la mutada enzima PBP2a y de esta forma inactiva MRSA. Su espectro es similar al de las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma), muy activo frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* no productores de BLEE, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp., *Haemophilus Influenzae*, *Morganella morganii*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*. No es activo frente a los bacilos no fermentadores: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, ni frente a gérmenes anaerobios como *Bacteroides fragilis* (Morejón, 2011).

La ceftarolina es también una cefalosporina activa frente a *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos sensibles y resistentes a meticilina (MRSA); así como, frente a las recientes cepas resistentes a vancomicina (VRSA) y daptomicin. También incluye en su espectro a *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo las cepas penicillin-resistentes), *Haemophilus influenza* (incluyendo las cepas productoras de beta-lactamasas), *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecalis*, incluyendo cepas resistentes a vancomicina e inactiva frente *Enterococcus faecium* (File y cols., 2012).

2.6.- MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Los β -lactámicos deben alcanzar sus puntos de fijación (PBP) en la cara externa de la membrana citoplásmica, lo que se consigue fácilmente en las bacterias grampositivas y, por difusión a través de las porinas, en las gramnegativas. La pérdida de las porinas constituye un mecanismo inespecífico de resistencia que muy a menudo produce resistencia cruzada para todos los compuestos que usan las porinas como vía de entrada a las bacterias. Las mutantes son resistentes simultáneamente a penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol y tetraciclinas; sin embargo, el nivel de resistencia alcanzado por esta vía no es muy alto y sólo suele tener significado clínico cuando se asocia con otros mecanismos de resistencia. Mutantes que carecen de la porina OmpC son resistentes a los β -lactámicos. Esta forma de resistencia es frecuente en enterobacterias como *Salmonella*, *Enterobacter* y en *Pseudomonas* y puede ser reversible (Tafur y cols., 2008; Galdiero, 2012).

2.6.1.- MODIFICACIONES DE LAS DIANAS DE ACCIÓN.

Un mecanismo habitual de resistencia a los β -lactámicos, frecuente en bacterias grampositivas, es la producción de PBP con una afinidad disminuida por estos antibióticos. El caso más característico de resistencia por este mecanismo es la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. La meticilina se une con gran

afinidad a la PBP2 de *S. aureus* produciendo la lisis de la bacteria. Son frecuentes los aislamientos de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina que, además de su PBP2 normal, presentan una forma nueva de esta proteína llamada PBP2a o PBP2' que tiene afinidad muy baja por la meticilina, siendo, por lo tanto, resistentes a este antibiótico (Brown y Reynolds, 1980; Hartman y Tomasz, 1984; Ubakata y cols., 1985). La unión de baja afinidad se puede atribuir, al menos en parte, a una reacción de acilación energéticamente desfavorable de la serina del sitio activo (Lim y Strynadka, 2002). La PBP2a presenta actividad transglucosidasa y transpeptidasa y realiza las funciones de las PBP1, PBP2, y PBP3, bloqueadas por los β -lactámicos, manteniéndose de esta forma la integridad de la pared (Ausina y Moreno, 2006). La proteína PBP2a es producto de un gen *mecA* presente sólo en el cromosoma de *S. aureus* resistentes a meticilina, que se supone que lo ha adquirido de otra especie bacteriana (Trees e landolo; 1988). Además de los mutantes resistentes a meticilina que llevan un gen *mecA*, se han aislado otras variantes de *S. aureus*, resistentes a diversos β -lactámicos, que producen una PBP2a con afinidad alterada por la penicilina o una gran cantidad de PBP4, una de las PBP de bajo peso molecular (Henze y Berger-Bachi, 1996; Memmi y cols; 2008).

Algunos derivados de la cefalosporina se unen a la PBP2a con afinidades superiores a otros β -lactámicos y son activos contra los estafilococos resistentes a la meticilina (Entenza y cols., 2002; Fung-Tomc y cols., 2002; Jhonson y cols., 2002). Estos compuestos tienen en común una cadena lateral relativamente prolongada unido al anillo α del núcleo compuesto β -lactámico (Chambers, 2003).

Los enterococos presentan una resistencia natural a muchos antibióticos β -lactámicos, especialmente cefalosporinas, debido a la baja afinidad de una de sus PBP (PBP5) que es capaz de sustituir la actividad de las otras PBP cuando son inhibidas por estos antibióticos (Canepari y cols., 1986; Sifaoui y cols., 2001). Se han aislado mutantes de enterococos con resistencia ampliada, que incluye penicilina y ampicilina, que producen mayor cantidad de PBP5 con afinidad disminuida para estos antibióticos (Fontana y cols., 1985 y 1994).

En el caso del neumococo, puede adquirir fragmentos de los genes que codifican PBP de microorganismos resistentes a β -lactámicos (probablemente de estreptococos *viridans*), e insertarlos por recombinación entre los genes que codifican PBP. Esto puede ocurrir hasta en 3 de sus PBP (1a, 2b y 2x) (Chambers, 1999).

2.6.2.- PRODUCCIÓN DE BETA-LACTAMASAS.

2.6.2.1- CLASIFICACIÓN DE BETA-LACTAMASAS.

La producción de β -lactamasas por las bacterias es el mecanismo más importante de resistencia a los β -lactámicos (Ambler, 1980). El anillo β -lactámico es hidrolizado por las β -lactamasas y convertido en compuestos biológicamente inactivos (Goodman y Gilman, 1991). En organismos grampositivos, la síntesis de β -lactamasas suele ser inducible por la presencia de antibiótico y las enzimas se secretan al medio externo en gran cantidad, con lo que la resistencia tiene un efecto poblacional (Medeiros, 1997). En bacterias gramnegativas, las β -lactamasas se sintetizan de forma constitutiva y en pequeña cantidad, secretándose posteriormente al periplasma.

La TEM-1 de *E.coli* fue la primera β -lactamasa aislada en el año de 1963 y posteriormente se aislaron la SHV-1 y la PSE-1 (Bishop y Weiner, 1992; Medeiros 1997; Spratt, 1975). Se han descrito más de 190 enzimas de tipo β -lactamasa, y constituyen la mayor causa de resistencia bacteriana hacia los antibióticos con anillos β -lactámicos (Kobayashi y cols., 1982).

La clasificación de β -lactamasas en función de su estructura molecular en cuatro clases (de la A a la D) fue propuesta por Ambler en 1980. En esta clasificación las β -lactamasas de las clases A, C y D tienen en su centro activo serina, mientras en la clase B son metaloenzimas (Ambler, 1980). Bush (1995) propone una modificación del esquema de Richmon y Sykes, intentando relacionar el sustrato y los perfiles de inhibición con la estructura molecular, lo que ha constituido la base de la clasificación

actual basada en características bioquímicas, físicas, espectro de hidrólisis y espectro de inhibición.

Clasificación molecular de Ambler (Ambler, 1980) (Cuadro 1, pag 40)

Las penicilinasas clase A (serin-penicilinasas) se pueden encontrar tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas y pueden ser de origen cromosómico o plasmídico. El peso molecular de estas enzimas está en torno a los 29.000 daltons.

Las de clase C (serin-cefalosporinasa) constituyen el principal mecanismo de resistencia de las bacterias gramnegativas. A este grupo pertenece la enzima ampC. Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefaloporinas, α -metoxicefalosporinas y no son afectadas por los inhibidores (Gupta, 2007) que además de la serina contienen en el centro activo DD-transpeptidasas/carboxipeptidasas. Son proteínas de gran peso molecular, cercano a los 36.000 daltons (Gundstorm y cols., 1980; Jaurin y Gundstrom, 1981).

Las de clase D (serin-oxacilinasas) presentan una gran actividad hidrolítica frente a oxacilinas y una sensibilidad frente al ácido clavulánico. Su peso molecular está en torno a los 29.000 daltons (Giulabi y cols., 2005).

Las de clase B (metaloenzimas), la unión del residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas se realiza mediante el ión cinc, a diferencia de las otras β -lactamasas (Gupta, 2007). Podemos distinguir 3 tipos de metalo- β -lactamasas, B1, B2 y B3. Los subtipos B1 y B3 englobarían enzimas con amplio espectro de acción que actuarían frente a la mayoría de los β -lactámicos excepto monobactamas, y presentan su máxima actividad cuando tienen dos átomos de cinc, mientras que B2 son carbapenemasas que presentan poca acción frente a penicilinas y cefalosporinas y se inactivan cuando incorpora otro átomo de cinc (Frere y cols., 2005).

	Class	β - lactamases	Examples
Serine β - lactamases	A	Broad spectrum β - lactamases	TEM-1, TEM-2, SHV-1
		ESBL TEM – type	TEM-3
		ESBL SHV – type	SHV-5
		ESBL CTX-M – type	CTX-M1, CTX-M9
	C	Carbapenemases	KPC
		AmpC cephamycinases (chromosomal encode)	AmpC
Metallo β - lactamases	D	AmpC cephamycinases (plasmid encode)	CMY, DHA
		Broad spectrum β - lactamases	OXA-1, OXA-9
	B	ESBL OXA – type	OXA-2, OXA-10
		Carbapenemases	OXA-48, OXA-23
		Metallo β - lactamases	VIM, IMP

Cuadro 1.- Clasificación de Amber de β -lactamasas.

Clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush y cols., 1995) (Cuadro 2, pag 41)

Esta clasificación considera los inhibidores de β -lactamasas y los sustratos de los β -lactámicos, y los clasifica en 4 grupos.

Las enzimas del grupo 1 se correlacionan con la clase molecular C. En este grupo se engloban cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico o sulbactam ni por el EDTA, pero son inhibidas por el aztreonam y cloxacilina. Su peso molecular suele ser de 30.000 daltons. La mayor parte de ellas son de origen cromosómico e hidrolizan fundamentalmente a cefaloridina y cefalotina.

Las del grupo 2 se correlacionan con la clase molecular A o D y son penicilinasas, cefalosporinasas y β -lactamasas de amplio espectro que son sensibles a la acción de los inhibidores de β -lactamasas. Dado el enorme número de sustratos podemos distinguir varios subgrupos. Los subgrupos se muestran en el cuadro 2.

Las β -lactamasas del grupo 3 se correlacionan con la clase molecular B. Son metalo- β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos excepto EDTA. Algunas de las β -lactamasas incluidas en este grupo son la β -lactamasa L1 de *P. maltophilia* con fuerte acción hidrolítica frente a Imipenem y la β -lactamasa II de *Bacillus cereus*.

Las del grupo 4 son penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. Hasta el momento no se han podido englobar en ninguna clase molecular.

Group	Type	Examples
1	Cephalosporinases	AmpCs, CMY-2
2	All clavulanic acid susceptible	
2a	Penicillinases	PC-1 from <i>S.aureus</i>
2b	Broad-spectrum penicillinases	TEM-1, SHV-1
2be	ESBLs	SHV-2, TEM-10, CTX-Ms
2br	Inhibitor resistant	TEM, IRT
2c	Carbenicillin hydrolyzing	PSE-1
2d	Oxacillin hydrolyzing	OXA-10, OXA-1
2e	Cephalosporinase inhibited by clavulanate	FEC-1
2f	Carbapenemases	KPC-1, SME-1
3	Metallo-beta-lactamases	IMP-1, VIM-1
4	Miscellaneous	

Cuadro 2.- β -lactamasas: clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros.

2.6.2.2- BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.

Las β -lactamasas de espectro extendido o BLEE, son enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de espectro extendido que contienen una cadena lateral oximino, entre las que están incluidas la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y también el aztreonam. No actúan sobre cefamicinas ni carbapenemas. Son inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el sulbactam o tazobactam (Patterson, 2003).

El uso excesivo de las cefalosporinas de amplio espectro, en los últimos años, ha dado lugar a una nueva problemática en el tratamiento de las infecciones productoras de BLEE a causa de las resistencias creadas (Gobernado, 2005). Dada la alta prevalencia de microorganismos productores de β -lactamasas, durante los años 80 se desarrollaron las cefalosporinas de tercera generación, estas cefalosporinas presentan menor nefrotoxicidad que los aminoglucósidos y las polimixinas, lo que condujo a su uso excesivo y, como consecuencia, a la aparición de las BLEE (Paterson y Bonomo, 2005). Estas enzimas, se presentan principalmente en enterobacterias, en concreto *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae*, pero también pueden aparecer en bacilos no fermentadores y otras enterobacterias. Son enzimas de configuración plasmídica producidas por bacilos gramnegativos.

Derivan de las β -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros; cuando estas sufren mutaciones.

Cefquinoma resiste a la mayoría de las β -lactamasas, pero puede resultar susceptible a las BLEE. Las BLEE (TEM, SHV y CTX-M entre otras) son secretadas por bacterias gramnegativas como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, y los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Jacoby y Muñoz, 2005).

2.7.- PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.

2.7.1.- ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

Las cefalosporinas son, en general, moléculas con carácter polar e hidrosoluble, lo que condiciona su absorción a nivel del tracto gastrointestinal. La incorporación de grupos electronegativos en las moléculas mejora la estabilidad en el medio ácido y permite la absorción entérica (entre el 50 y 95 %) de cefalexina, cefadroxilo, cefradina y cefaclor en pequeños animales (Waterman y Scharfenberger 1978; Lavy y cols., 1997;

Campbell y Rosin, 1998), aunque no lo hacen con tanta eficiencia en grandes animales, siendo la biodisponibilidad oral entorno al 50-75% en perros y gatos (Lavy y cols., 1997; Wackowicz y cols., 1997; Carli y cols., 1999) e inferior al 10% para cefalexina en equinos (Davis y cols., 2005).

Las cefalosporinas formuladas en forma de éster mejoran la liposolubilidad, aumentando así su biodisponibilidad oral. Es lo que sucede en el caso de cefpodoxima proxetilo (Campbell y Rosin, 1998) o de la cefuroxima, formulada como cefuroxima axetilo, un profármaco que se activa tras su hidrólisis en la mucosa intestinal e hígado (Giguère y cols., 2006) y de gran uso en clínica humana.

También existen otros factores, que pueden condicionar la absorción de las cefalosporinas, como es la presencia de alimentos (Campbell y Rosin, 1998) o la edad, como se observa con la administración oral de cefadroxilo en equinos, con mejor biodisponibilidad en potro que en adultos (Wilson y cols., 1985; Duffee y cols., 1989), probablemente influenciado por las diferencias de pH en el tubo digestivo, ya que los primeros son animales lactantes con predominio de un medio ácido, a diferencia de los segundos cuyo pH es más alcalino.

El cuanto a las cefalosporinas inyectables, difieren escasamente en su absorción parenteral, aunque la estabilidad y unión a las proteínas tisulares son variables condicionando a la misma. Tras la administración intramuscular y/o subcutánea la absorción varía entre un 60 y 100%, con picos de concentración plasmática máximos entre 30 y 60 minutos postadministración. Así, por ejemplo, tras la administración intramuscular de cefotaxima (Atef y cols., 1990), cefuroxima (El-Sooud y cols., 2000) y ceftriaxona (Ismail, 2005) a cabras se observó una biodisponibilidad del 100, 90 y 85 %, respectivamente. En bovinos, la cefalexina se absorbió en un 68 % por la misma vía (Soback y cols., 1988), mientras que en equinos la cefapirina (Brown y cols., 1987) y la cefoxitina (Brown y cols., 1986), lo hicieron en un 95 y 77 %, respectivamente.

2.7.2.- DISTRIBUCIÓN.

Las cefalosporinas son moléculas ácidas por lo que en el organismo se comportan como moléculas polares. Son muy poco liposolubles y poseen una capacidad deficiente para penetrar las células. El volumen de distribución generalmente se encuentra entorno 0,2 - 0,5 L/kg (Guerrini y cols., 1985; Limbert y cols., 1991; Swati y cols., 2010; Patel y cols., 2010). Por otro lado, las cefalosporinas tienen una muy buena distribución en los líquidos extracelulares, debido a su baja unión a proteínas plasmáticas en animales. A diferencia de lo que sucede en animales, existen evidencias que la unión a las proteínas plasmáticas de muchas cefalosporinas es elevada en seres humanos. La ceftriaxona, se une en un 90 a 95 % a proteínas plasmáticas en personas mientras que en perros posee sólo un 25 % de unión a bajas concentraciones y un 2 % a elevadas concentraciones (Popick y cols., 1987; Papich y cols., 2010). La cefazolina posee un elevado porcentaje de unión en personas (85 %), pero es bajo en perros (19 %) favoreciendo una rápida distribución desde el plasma al líquido intersticial (Rosin y cols., 1993). El mayor porcentaje de unión a proteínas del plasma en animales ocurre con cefovecina, que se une un 99 % en perros y gatos (Stegemann y cols., 2006a y 2006b).

La distribución de las cefalosporinas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es limitada y las concentraciones en este líquido corresponden entre un 0,5 y 2 % de las concentraciones máximas logradas en sangre. Esto es debido a las características físico-químicas de las cefalosporinas y, si logran alcanzar el LCR, son transportadas activamente fuera del sistema nervioso central. Sin embargo, este mecanismo se interrumpe en el caso de inflamación meníngea. Además la meningitis, altera las uniones celulares estrechas, el transporte de vesículas, y, por lo tanto, el paso de beta-lactámicos a través de la BHE, que se ve favorecida, logrando concentraciones del 55 % respecto al pico de concentración plasmática (Giguère, 2006). Algunas cefalosporinas, a diferencia de la mayoría, consiguen alcanzar concentraciones significativas en LCR:

cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, cefmenoxima, moxalactam y ceftazidima (Flórez, 2014).

En los huesos, articulaciones y músculo, la distribución es aceptable para todo el grupo, aunque es inferior con agentes de tercera generación. La cefazolina penetra en el hueso normal y osteomielítico, y las concentraciones son similares a las plasmáticas (Daly y cols., 1982). Esto determina el uso efectivo de cefazolina para la prevención y tratamiento de osteomielitis y es el antibiótico de uso más común para procedimientos ortopédicos (Rosin y cols., 1993).

La cefapirina y el ceftiofur, experimentan una gran disposición en los líquidos intraperitoneal y sinovial (Schurman y cols., 1976; Meyer y cols., 2009). La ceftazidima, ceftizoxima y cefuroxima generan niveles terapéuticos en el ojo (Barza y cols., 1993) y la cefotaxima y cefradina en el oído medio (Aslam y cols., 2004). En la piel, la disposición es adecuada para la cefalexina y cefadroxilo (Frank y Kunkle, 1993).

En los aparatos digestivo y urinario, todo el grupo genera concentraciones terapéuticas, especialmente en orina, debido a que es la principal vía de excreción (Flórez, 2014).

La distribución de cefalosporinas hacia la glándula mamaria y el consecuente acceso a la leche es limitada, esto se debe a que la cantidad de fármaco secretado a la leche aumenta en la medida que lo hace su liposolubilidad y disminuye su peso molecular, su afinidad por proteínas plasmáticas y su grado de ionización. En lo referente a este último aspecto, la proporción de fármaco ionizado/no ionizado es una función de la interacción entre el pKa que posea y el pH del medio donde se encuentre. Como el pH normal de la leche ($\approx 6,5 - 6,7$) es menor que el pH del plasma ($\approx 7,4$), las moléculas bases débiles, que en sangre se encuentran mayoritariamente como no ionizadas, difundirán con mayor facilidad hacia la leche que las moléculas ácidas, y una vez en ese medio, el equilibrio virará hacia la fracción ionizada (Ito y Lee, 2003; Martínez y Modric, 2010; Rule y cols., 2011).

2.7.3.- METABOLISMO Y EXCRECIÓN.

Las cefalosporinas son, en general, mínimamente metabolizadas en el hígado (Flórez, 2014). Agentes como la cefotaxima, cefacetrilo, cefalotina y cefapirina se metabolizan por esterasas que escinden grupos 3-acetoximetil del anillo dihidrotiazínico, convirtiéndolas en lactonas inactivas. Los compuestos desacetilados se eliminan principalmente por orina, conservando cierta actividad antibacteriana (Mella y cols., 2001).

En bovinos y porcinos, el ceftiofur primero es degradado por esterasas y luego conjugado, generando los metabolitos: desfuroil-ceftiofur-glutation-disulfuro (hígado), 3-3-desfuroilceftiofur-disulfuro (orina) y desfuroil-ceftiofur-cisteína-disulfuro (plasma, tejidos y orina) (Jones, 1989; Hornish y Kotarski, 2002).

Las cefalosporinas son rápidamente eliminadas tras su administración sistémica. El órgano principal de excreción es el riñón, y las concentraciones urinarias de estas moléculas son elevadas. La filtración glomerular y la secreción tubular conforman los principales mecanismos de eliminación de cefalosporinas (Riviere, 2009). En general, poseen semividas de 1 a 2 horas, pero algunas (particularmente de tercera generación), pueden tener una semivida más prolongada posiblemente por la limitada secreción tubular, elevada afinidad por las proteínas plasmáticas y mínima degradación. Por ejemplo, el ceftiofur se metaboliza en un metabolito activo y tiene una semivida de 3 a 4 h en bovinos, 4 h en perros y 2,5 h en caballos. Otras cefalosporinas de tercera generación con semividas más prolongadas se comprueba que incorporan en el C3 del anillo beta-lactámico estructuras de 3 ó 4 átomos de nitrógeno, como ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima y latamoxef (Hornish y Kotarski, 2002; Riviere, 2009).

La reducción de la función renal impone un ajuste en el régimen de dosificación, debido a la importancia de la eliminación urinaria, excepto para compuestos que se metabolizan o eliminan principalmente por bilis. En general

aquellos compuestos de elevado peso molecular y gran afinidad proteica, como la cefoperazona, son excretados por la bilis en gran medida (75%). Otros compuestos que se eliminan por esta vía en gran proporción son la ceftriaxona y el latamoxef, motivo por el cual están contraindicados en el equino y otros herbívoros con intestino grueso expandido. La alteración hepática no requiere el ajuste de dosis, puesto que la menor excreción biliar se compensa con mayor eliminación urinaria; el ajuste sólo es indispensable cuando coexisten ambas patologías (Giguére, 2006).

2.8.- INTERACCIONES.

Las cefalosporinas no presentan muchas interacciones en comparación con otros fármacos, en especial aquellos que son inhibidores o inductores del citocromo P450.

A nivel estructural, la principal interacción producida por las cefalosporinas, se produce en aquellas que presentan en su estructura una cadena lateral en posición 3 con un núcleo del metil-tiotetrazol. Este núcleo puede producir una intolerancia a la ingesta de alcohol etílico, produciendo una reacción llamada "reacción tipo disulfiram". En un metabolismo normal, el alcohol se metaboliza en el hígado por la enzima alcohol deshidrogenasa, que lo transforma en acetaldehído, que es procesado por la acetaldéhidó deshidrogenasa para dar ácido acético inocuo. El disulfiram bloquea ésta última reacción, impidiendo que se metabolice el acetaldehído y provocando por tanto que sus concentraciones plasmáticas aumenten de 5 a 10 veces. Ya que el acetaldehído es el responsable de la "resaca" alcohólica, el ingerir alcohol bajo los efectos del disulfiram produce una rápida e intensa resaca, mucho más grave e incluso peligrosa en pacientes con problemas cardiacos o hepáticos si no están asistidos, desde 5-10 minutos tras la ingestión del alcohol hasta un período que varía entre 30 minutos y varias horas. Los síntomas típicos de este exceso de acetaldéhidó incluyen rash cutáneo, taquicardia, respiración entrecortada, náuseas y vómitos, y en algunos casos puede llegar a causar la muerte (Mcmahon, 1980; Dámaso, 1990; Nakamura y cols., 1984; Kamei y cols., 1987; Dong y cols., 2013).

Aunque en general, las cefalosporinas de administración oral que contienen grupos éster suelen aumentar su absorción con su administración conjunta con alimentos (Lode y cols., 1994), como en el caso de cefuroxima cuya biodisponibilidad aumenta del 30 al 40%, existen otros casos en la que los alimentos disminuyen la biodisponibilidad, como por ejemplo en el caso del ceftibuteno (Gómez y cols., 2015).

Las cefalosporinas, por ser fármacos de amplio espectro, pueden alterar la flora bacteriana del intestino, y de ese modo, interferir en procesos de absorción de otros fármacos mediante ciclos enterohepáticos, como ocurre con el caso de algunos anticonceptivos orales (Rivas y cols., 2002).

Como ocurre con otros antibacterianos con actividad bactericida, su uso concomitante con antibióticos bacteriostáticos, puede resultar en una disminución de su actividad, debido a que, para que las cefalosporinas puedan ejercer su efecto bactericida, es necesario que las bacterias se encuentren en crecimiento, ejemplo que puede verse al usar tetraciclinas junto con cefalosporinas (Cordies y cols., 1998). Por otro lado, pueden sufrir sinergismo con otros antibióticos, principalmente aquellos bactericidas como los aminoglucósidos (Allan y Machado, 1998).

En cuanto a su eliminación, el probencid un agente uricosúrico que aumenta la excreción del ácido úrico en orina por inhibición del transportador de aniones, que también produce una disminución del aclaramiento renal de las cefalosporinas, aumentando las concentraciones máximas y el AUC. Aunque la mayoría de las cefalosporinas se ven afectadas en menor o mayor medida, existen algunas en las que el probencid no parece tener ningún efecto: ceforanida, ceftazidima, ceftriaxona (Brown, 1993) y ceftiofur (Ficha técnica Cefenil®).

Merece la pena destacar, más que una interacción, la incompatibilidad de algunas cefalosporinas, principalmente estudiado con ceftriaxona, con el calcio, que producen precipitados, y nunca deben coadministrarse por la misma vía (Steadman y cols., 2010).

2.9.- TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS.

En conjunto, las cefalosporinas son fármacos seguros. Los efectos secundarios son infrecuentes y habitualmente leves. Existen una serie de reacciones adversas comunes a prácticamente todas las cefalosporinas, mientras que otras afectan solo a algunos grupos en función de la presencia de determinadas estructuras químicas en su molécula o de su actividad y espectro (García-Sánchez y cols., 1999).

2.9.1.- REACCIONES ADVERSAS GASTROINTESTINALES.

Las alteraciones gastrointestinales son más comunes en las cefalosporinas administradas por vía oral. Algunas cefalosporinas administradas por vía IV, que se eliminan en gran cantidad por bilis, como cefoperazona, producen más frecuentemente náuseas y diarrea (Carlberg y cols., 1982) llegando a presentarse en un 5% en una serie de pacientes (Brogden y cols., 1981). Entre las reacciones adversas gastrointestinales se han descrito: diarrea, náuseas, vómitos, anorexia, dolor abdominal, aerofagia, meteorismo, gastralgia, epigastralgia, estreñimiento, etc...

Aunque de manera infrecuente, también se han notificado casos de colitis pseudomembranosa (Dámaso, 1990), producida habitualmente por toxinas de *Clostridium difficile*.

2.9.2.- REACCIONES ADVERSAS HEMATOLÓGICAS.

El uso de cefalosporinas ha sido asociado a anormalidades hematológicas como leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, linfopenia, trombocitosis, leucocitosis, linfocitosis, eosinofilia, disminución el hematocrito y de la hemoglobina. Estas reacciones solo se producen en raras ocasiones (Dámaso, 1990).

Otro fenómeno relacionado con grandes dosis de estos antibióticos es una reacción de Coombs positiva y aunque la hemólisis no suele asociarse con este fenómeno, ésta se ha publicado en algunas ocasiones, particularmente asociado a ceftriaxona y en pacientes con déficit de 6-Fosfato deshidrogenasa (Leaf y cols., 2010).

También se ha relacionado a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, principalmente cefotetan, con anemia hemolítica grave (Shariatmadar y cols., 2004).

Asimismo, se han descrito alteraciones de la coagulación por bloqueo de la síntesis de protrombina y de otros factores dependientes de la vitamina K, además de alteración de la función plaquetaria, tras el uso de cefalosporinas a altas dosis (Rivas y cols., 2002).

En un 4% de los pacientes tratados con cefalosporinas se observó eosinofilia (Fass y cols., 1970; Mouallem, 1976) aunque no se ha identificado si ello es debido al propio fármaco o es debido a una reacción fisiológica al tratamiento de la infección.

La neutropenia es una reacción bastante rara en relación con las cefalosporinas, suele aparecer en menos del 0,5% de los pacientes, y rara vez los recuentos descienden de 1000 neutrofilos/mm³, aunque se han descrito algunos casos de neutropenias por debajo de 500 neutrofilos/mm³ (Homatouni y cols., 1979; Norrby, 1987), aunque su recuperación suele ser rápida tras la suspensión del tratamiento.

2.9.3.- REACCIONES ADVERSAS HEPÁTICAS.

Aunque no es habitual, también se ha relacionado a las cefalosporinas con elevación de transaminasas, fosfatasa alcalina, lactatodeshidrogenasa y bilirrubina (Dámaso, 1990). La incidencia varía en función de las características de los pacientes estudiados, en un estudio la incidencia alteraciones hepáticas en pacientes en

tratamiento con cefuroxima fue del 24%, pero el porcentaje que se relacionó con el uso del fármaco, y no por otros factores de riesgo, fue menor (Norrby y cols., 1977). Este tipo de reacciones adversas se relacionan principalmente con moxolactam (Rivas y cols., 2002).

Dado que las cefalosporinas son de los antibacterianos más usados en todo el mundo, el número reacciones adversas de tipo hepático notificadas es elevado, pero su incidencia asociada al uso cefalosporinas es baja (Kwon y cols., 2012)

2.9.4.- REACCIONES ADVERSAS RENALES.

En general, con todas las cefalosporinas, se han descrito aumentos ligeros y transitorios de las cifras de urea y creatinina séricas y disminución del aclaramiento de creatinina en enfermos con alteración previa de la función renal (Dámaso, 1990)

Algunas cefalosporinas como la cefaloridina son potencialmente nefrotóxicas, se acumulan en el túbulo proximal (Silverblatt y cols., 1970) y pueden producir proteinuria o incluso ocasionar una nefritis intersticial o una necrosis tubular aguda, cuando se administran dosis diarias mayores de 4g (Simpson, 1971).

Otra cefalosporina como la cefalotina, se ha relacionado con nefrotoxicidad aguda en pacientes humanos que recibían dosis usuales (8g–12g/día) en pacientes con enfermedad renal preexistente o cuando se asocia a fármacos nefrotóxicos, como aminoglucósidos y en pacientes ancianos (Rivas y cols., 2002).

2.9.5.- REACCIONES ADVERSAS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Son infrecuentes y en general, cuando se presentan, de escasa relevancia. Entre ellas encontramos cefaleas, alucinaciones, vértigo, confusión mental, ansiedad, etc. (Dámaso, 1990).

Con cefemas, cuya cadena lateral en posición 3 es un núcleo del metil-tiotetrazol, se ha descrito un tipo de toxicidad que consiste en una intolerancia aguda

al alcohol etílico semejante a la que ocurre con el disulfiram (Nakamura y cols., 1984), se piensa que puede ser debida a la inhibición, por parte del antibiótico, de la enzima acetaldehído-deshidrogenasa (Kamei y cols., 1987), lo que origina un incremento notable de la concentración sanguínea del acetaldehído. El cuadro se caracteriza, pocos minutos después de la ingesta de alcohol, por enrojecimiento y sensación de calor en cara, conjuntivas, hombros, tórax y espalda, acompañados de náuseas, vómitos, sudoración, taquicardia y cefalea y más raramente de hipertensión o hipotensión, mareo, vértigo, síncope, dolor torácico y exantema macular en cara y pecho (Mcmahon, 1980). Su duración suele ser corta, desapareciendo los síntomas en unos minutos o pocas horas (Dámaso, 1990).

2.9.6.- REACCIONES ALÉRGICAS.

Los beta-lactámicos son uno de los grupos de fármacos que más reacciones de hipersensibilidad producen (Sánchez-Sáncho y cols., 2003; Weiss y Adkinson, 1988). Las cefalosporinas son los segundos beta-lactámicos, después de las penicilinas, que producen más reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE (Blanca y cols., 1994).

El riesgo relativo de sufrir una de estas reacciones se encuentra entre 1:1.000 y 1:100.000 (Gadde y cols., 1993; Kelkar y Li 2001), aumentando en pacientes alérgicos a penicilinas en un uno de cada cuatro pacientes (Campagna y cols., 2012).

Las penicilinas son capaces de actuar como haptenos capaces de combinarse con proteínas propias del organismo generando un complejo antigénico sensibilizante. Una vez sensibilizado, el paciente puede manifestar una reacción alérgica a la penicilina. Peniciloil y ácido penicilánico son productos que se forman cuando el anillo beta-lactámico se abre y son considerados como los principales factores determinantes de la alergia a la penicilina (Lockey y Bukantz, 1999; Vervloet, 2003). Las cefalosporinas también son sospechosas de formar haptenos, aunque se desconocen los productos químicos específicos, además las cefalosporinas son más

inestables y experimentan un metabolismo más intenso que las penicilinas, dando origen a nuevos antígenos (Silviu y cols., 1993; Baldo, 1999). Las cadenas laterales también son inmunogénicas y al igual que en el caso de las aminopenicilinas, pueden ser responsables de monosensibilizaciones o de sensibilizaciones cruzadas entre fármacos que comparten la misma cadena lateral.

En los primeros estudios que comparaban la reactividad cruzada entre penicilinas y cefalosporinas, las cifras se encuentran sobreestimadas debido a que en las primeras cefalosporinas sintetizadas había trazas de penicilinas (Kelkar y Li, 2001). En un estudio 15.987 pacientes que fueron tratados con cefaloridina, cefalexina, cefalotina, cefazolina, o cefamandol, 8.1% de aquellos con una historia de alergia a la penicilina presentaron reacción alérgica a estas cefalosporinas, en comparación con 1,9% de los que no presentaban historial de alergia a penicilinas. Por lo tanto, el riesgo de sufrir una reacción alérgica fue cuatro veces superior (aproximadamente) en los pacientes alérgicos a la penicilina (Lin, 1992). Dado que el hapteno de las cefalosporinas aun no está totalmente claro, no es posible saber exactamente el mecanismo de acción de esta reactividad cruzada.

Las reacciones de hipersensibilidad pueden manifestarse con urticarias, exantemas, angioedemas, e incluso shock anafiláctico. Se han descrito casos de síndrome de Stevens-Johnson con algunas cefalosporinas como es el caso de la cefoxitina (Mcarthur y Dymment 1975; Kannangara y cols., 1982).

2.9.7.- REACCIONES ADVERSAS CARDIACAS.

En general, las cefalosporinas son fármacos seguros desde el punto de vista cardiológico. A pesar de eso, se ha descrito, en rara ocasión, algún caso de miocarditis que fue diagnosticada post-mortem (Chikwava y cols., 2006).

2.10.- APLICACIONES TERAPEÚTICAS DE LAS CEFALOSPORINAS.

Las cefalosporinas fueron originalmente introducidas en clínica para el tratamiento de infecciones producidas por estafilococos resistentes (productores de penicilinasas), con la ventaja que estos fármacos poseen también un espectro de actividad similar contra gramnegativos, tal como las aminobenzilpenicilinas de espectro ampliado. Las alteraciones (variaciones) de las cadenas laterales del núcleo del ácido 7-aminocefalosporánico y el descubrimiento de las cefamicinas condujeron a una creciente estabilidad frente a las beta-lactamasas de las bacterias gramnegativas, incluyendo *Bacteroides fragilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este incremento en la estabilidad, por lo usual, es a expensas de reducir la actividad contra grampositivas y a variaciones en la farmacocinética (Giguère, 2006).

En veterinaria, las cefalosporinas de primera generación son utilizadas principalmente en perros, para el tratamiento de infecciones de piel, urinarias y respiratorias, usándose algunas por vía oral como cefalexina y cefradoxilo (Chatfield y cols., 1984; Barsanti y cols., 1985; Mcdonald, 1989). Las de segunda y tercera generación son usadas para tratar microorganismos resistentes a las cefalosporinas de primera generación (Petersen y Rosin, 1993; Giguère, 2006).

En humanos las cefalosporinas de primera generación se emplean de forma segura y efectiva en la profilaxis de intervenciones quirúrgicas. Una dosis única de cefazolina justo antes de la cirugía es la profilaxis recomendada para procedimientos en los cuales la flora de la piel sean los probables patógenos implicados. Dependiendo de su vida media y la duración de la operación se empleará uno u otro fármaco. Los que poseen una vida media corta -cefapirina, cefalotina- se eliminan de los tejidos en aproximadamente dos horas y aquellos que tienen una vida media más larga -cefazolina- se eliminan en unas seis horas. Se recomienda que la primera dosis sea administrada más o menos 30 minutos antes de la incisión de la piel (excepto en las cesáreas en que la primera dosis se debe administrar inmediatamente después de ligar el cordón umbilical). Si la intervención dura más de dos horas, se debe administrar una segunda dosis, si la cefalosporina que se usó es de acción corta se

administrará una tercera dosis a las 4, 6 horas después de finalizar la intervención (Rivas y cols., 2002).

Las cefalosporinas, con o sin la adición de un aminoglicósido, son consideradas como los agentes terapéuticos de elección en infecciones severas causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* y especies de *Haemophilus*.

Las de primera generación deben ser empleadas para el tratamiento o la prevención de infecciones por microorganismos grampositivos y particularmente como profilácticos en intervenciones quirúrgicas de colocación de prótesis óseas y osteo-articulares. Asimismo, se ha publicado que el uso de cefazolina es de gran utilidad en emergencias ginecológicas (cesárea) (Rouzzi y cols., 2000).

Las cefalosporinas de segunda generación se deben utilizar para el tratamiento o prevención de infecciones por gérmenes gramnegativos, especialmente las producidas por *Enterobacteriaceae*, debido a que son activas en altos porcentajes y a que estos gérmenes habitualmente son resistentes a las primeras cefalosporinas. Existen diferencias entre cefalosporinas de esta generación. Cefoxitina es muy activa contra *B. fragilis* por lo que se usa en el tratamiento o profilaxis de sepsis intraabdominales. Cefamandol tiene mayor actividad contra *H. influenzae*. Cefuroxima, al igual que algunas cefalosporinas de tercera generación, es excelente para el tratamiento de neumonías adquiridas en la comunidad, por ejemplo, aquellas causadas por *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo las cepas resistentes a penicilinas), *H. Influenzae*. Cefoxitina y cefotetan tienen buena actividad para las terapias combinadas bajo ciertas condiciones (Rivas y cols., 2002).

Las cefalosporinas de tercera generación cubren enterobacterias poco habituales (*Citrobacter*, *Providencia*) e inhiben a las más comunes a concentraciones mucho más bajas. Son eficaces sobre un 50-75% de especies de *Pseudomonas aeruginosa* pero no deben ser usadas solas en el tratamiento de infecciones producidas por estos microorganismos, debido a la rápida presentación de resistencia.

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser tratadas eficazmente con una terapia combinada entre una cefalosporina de tercera generación (ejemplo: ceftazidima) y una fluoroquinolona o un aminoglicósido (Harvey, 1992; Tessier y cols., 1999).

2.11.- CEFTIOFUR.

El ceftiofur es una cefalosporina de uso exclusivo en medicina veterinaria, que se describió en 1987 (Yancey y cols., 1987). Cuando se introdujo su uso se clasificaba como una cefalosporina de nueva generación ya que no encajaba completamente dentro de la llamada tercera generación de cefalosporinas (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003). Hoy en día se considera una cefalosporina de tercera generación. Se encuentra dentro del grupo terapéutico “Antibacterianos para uso sistémico, cefalosporina de tercera generación”, y su código ATCvet es: QJ01DD90.

2.11.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA Y RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

El (6*R*,7*R*)-7-[[[(2*Z*)-2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetyl]-amino]-3-(furan-2-carbonylsulfanylmethyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-ácido carboxílico o ceftiofur (Figura 10), se utiliza comúnmente como sal sódica, cuya fórmula química es $C_{19}H_{16}N_5NaO_7S_3$ y su masa molecular es de 545.54 Da (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003). El ceftiofur también se utiliza como clorhidrato y, más recientemente, como ácido libre cristalino (EMEA/CVMP/80785/2006-FINAL). Ceftiofur es un ácido orgánico cuya solubilidad es pH dependiente, mayor de 400mg/mL en agua a pH > 5.5, aunque gelifica con el tiempo. A concentraciones por debajo de 70 mg/mL no gelifica ni precipita (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003).

El ceftiofur sódico en polvo no reconstituido debe ser almacenado protegido de la luz y a temperatura ambiente. Su color puede variar desde blanquecino a bronceado, sin que se afecte su potencia. Tras su reconstitución con agua estéril, la solución es estable durante 7 días si está refrigerada y no más de 12 horas a temperatura ambiente (15-30°C). Sin embargo, la ficha técnica de Cefenil® (50mg/mL), autorizado para su uso en porcino y bovino, indica que el periodo de validez después de su disolución o reconstitución es de sólo 24 horas. La formación de precipitados durante la refrigeración no invalida su potencia y utilidad, siempre que se logre su disolución. Las soluciones congeladas reconstituidas son estables durante 8 semanas (Plumb, 2010).

Los grupos químicos involucrados en la actividad del ceftiofur son el aminotiazol, que intensifica la afinidad por PBPs de gramnegativas, y el grupo metoximino, que le confiere estabilidad frente a las betalactamasas (Klein y Cunha, 1995; Lancini y cols. 1995; Livermore, 1998), ambos sobre el carbono 7 y comunes en varias cefalosporinas de tercera generación (en R1), y el grupo sulfonil-carbonil-furano (en R2).

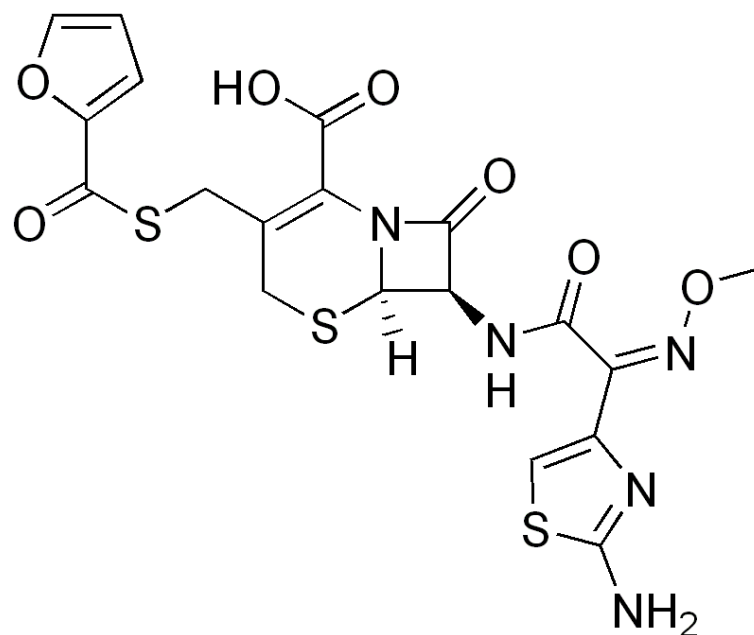


Figura 10.- Estructura química del ceftiofur.

La biodegradación del ceftiofur en el medio ambiente (en agua) se produce principalmente por rotura del anillo β -lactámico y está condicionada por la temperatura. Este derivado aldehídico, a penas presenta actividad antimicrobiana (Li y cols., 2001).

2.11.2.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO.

El espectro de actividad antimicrobiana de ceftiofur es muy amplio, incluyendo bacterias grampositivas como *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus* (meticilin sensibles) y aun mayor actividad sobre bacilos gramnegativos como *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacteriaceae spp*, *Pasteurella spp*, *Citrobacter spp*, *Serratia marcescens* etc.). Por otro lado, frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* (meticilin resistente) presentan una menor actividad que otras cefalosporinas de tercera generación. Es activo frente a cepas productoras de betalactamasas y sobre anaerobios como *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides melaninogenicus* (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003). *Bordetella bronchiseptica* es intrínsecamente no sensible al ceftiofur (ficha técnica Excenel®). El tratamiento de la salmonelosis en terneros neonatos mediante dosis altas (uso no contemplado) de 5 mg/kg, IM, cada 24 horas, mejora a los animales y promueve su curación (eliminación de las bacterias) siempre que se mantengan concentraciones plasmáticas por encima de la CMI (Fecteau, 2003).

En el organismo es metabolizado a desfuroylceftiofur o desfuroilceftiofur (DFC), que presenta actividad antibacteriana, *in vivo* (Naxcel® information, 1994) aunque *S. aureus* es de cuatro a ocho veces menos sensible a desfuroilceftiofur (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003) que al ceftiofur (Jaglan y cols., 1994).

Se estudio la actividad *in vitro* de ceftiofur (Salmon y cols., 1996) y su metabolito principal, desfuroilceftiofur, frente a 539 aislados (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus somnus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, estafilococos y estreptococos). En general, el ceftiofur y su metabolito

fueron equivalentes en actividad contra los organismos gram-negativos con unas CMI semejantes. Contra los estafilococos, las diferencias en las CMI fueron mayores, de 1 y 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Frente a *Streptococcus suis*, y en general frente a estreptococos, el metabolito resultó ser 5 veces menos eficaz que el Ceftiofur (CMI90 de 0.03 $\mu\text{g/mL}$ y 0.0019 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Las concentraciones mínimas inhibitorias siguientes han sido determinadas para ceftiofur en cepas europeas de bacterias aisladas de animales enfermos:

Porcino		
Microorganismo (número de cepas)	Rango de CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMI90 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>A. pleuropneumoniae</i> (28)	$\leq 0.03^*$	≤ 0.03
<i>Pasteurella multocida</i> (37)	$\leq 0.03 - 0.13$	≤ 0.03
<i>Streptococcus suis</i> (495)	$\leq 0.03 - 0.25$	≤ 0.03
<i>Haemophilus parasuis</i> (16)	$\leq 0.03 - 0.13$	≤ 0.03
Bovino		
<i>Mannheimia spp.</i> (87)	$\leq 0.03^*$	≤ 0.03
<i>P. multocida</i> (42)	$\leq 0.03 - 0.12$	≤ 0.03
<i>H. somni</i> (24)	$\leq 0.03^*$	≤ 0.03
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (123)	$\leq 0.03 - 0.5$	0.25
<i>Escherichia coli</i> (188)	0.13 - > 32.0	0.5
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (67) (aislados de casos de panadizo interdigital)	0.06 - 0.13	ND
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (2) (aislados de casos de metritis aguda)	0.03 - 0.06	ND

*Sin rango; todos los aislados alcanzaron el mismo valor. ND: no determinada.

El actual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antes denominado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó los siguientes puntos de corte para los patógenos respiratorios porcinos y bovinos:

Diámetro del halo (mm)	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretación
≥ 21	≤ 2.0	(S) Susceptible
18 - 20	4.0	(I) Intermedio
≤ 17	≥ 8.0	(R) Resistente

Además de estos datos de las fichas técnicas, se han realizado diversos estudios sobre la sensibilidad de aislados de diversas especies domésticas al ceftiofur. Cuarenta cepas de *E. coli*, 32 cepas de *S. aureus*, 5 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 15 aislamientos de *Salmonella* spp., 12 aislamientos de *Proteus* spp., 10 aislamientos de *Pasteurella multocida*, además de 3 aislamientos de *C. ovis* se utilizaron para comprobar su susceptibilidad contra diferentes fármacos antibacterianos. La prueba de difusión en disco reveló que la mayoría de las cepas de *P. multocida* fueron altamente sensibles al ceftiofur sodio con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que oscilan entre 0.625-2.5 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración mínima bactericida (CMB) igual o dos veces la CMI (Al-Kheraije, 2013). Frente a *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, aislados de caballos con enfermedad respiratoria, entre el año 2007 y 2008, la CMI₉₀ fue de 0.12 $\mu\text{g/mL}$ y un punto de corte de ≤ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (Bade y cols., 2009). En un estudio (Salmon y cols., 1995), se obtuvieron y compararon las CMI de ceftiofur enrofloxacin, ampicilina, sulfametazina, trimetoprim-sulfadiazina, ritromicina, lincomicina, espectinomicina, lincomicina-espectinomicina (1:8), tilmicosina, y tetraciclina, en 515 aislamientos bacterianos de cerdos de los Estados Unidos, Canadá y Dinamarca con diversas enfermedades. Los organismos ensayados fueron *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. En general, ceftiofur y enrofloxacin fueron los antimicrobianos más activos contra todos los

aislamientos, con unas CMI90 para los aislados ensayados de <2,0 y <1,0 mg/mL, respectivamente.

2.11.3.- INDICACIONES CLÍNICAS.

El ceftiofur tiene buena utilidad, demostrada, en infecciones de diversa índole y en diferentes especies animales, sin embargo debe tenerse en cuenta que selecciona cepas resistentes como bacterias portadoras de β -lactamasas de amplio espectro (BLAE) que pueden representar un riesgo para la salud humana si esas cepas se propagan a los seres humanos, por ejemplo, a través de los alimentos. Su uso inadecuado puede aumentar la prevalencia de esas resistencias. Por ello, debe reservarse al tratamiento de cuadros clínicos que hayan respondido mal o que previsiblemente vayan a responder mal (se refiere a casos muy agudos que obliguen a instaurar tratamiento sin un diagnóstico bacteriológico) al tratamiento de primera línea. Es, por tanto, un antibiótico de reserva cuyo uso debe basarse, siempre que ello sea posible, en pruebas de sensibilidad. No se debe utilizar para la prevención de enfermedades ni como parte de programas sanitarios de rebaños. El tratamiento de grupos de animales debe limitarse estrictamente a brotes activos causadas por gérmenes sensibles.

En diversos estudios, se ha comprobado su eficacia y seguridad en aves, bovino, caprino, ovino, porcino, equino y en perro. En EEUU y Canadá está autorizado su uso en ellas:

Aves: en colibacilosis, sobre todo en pollitos y pavitos de pocos días (Arrijo-Dechert, 2002).

Vacuno: En metritis agudas, a partir del día 14 posparto, causadas por gérmenes susceptibles (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003).

A la dosis de 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea en vacas lecheras sanas, de ceftiofur (como clorhidrato de ceftiofur), las concentraciones en los tejidos uterinos y en líquido loquial tras el parto, exceden a las concentraciones mínimas inhibitorias reportados (CMI) para los patógenos comunes (*Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides spp.*, y *Arcanobacterium pyogenes*) asociados con la metritis puerperal aguda (Okker y cols., 2002).

En pododermatitis agudas (ceftiofur hidroclohidrato), como necrobacilosis interdigital asociada a *F. necrophorum* y *B. melaninogenicus* (Arrijoja-Dechert, 2002).

En infecciones del tracto respiratorio, incluido el complejo *respiratorio bovino* (CRB), o también conocida como Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB), causado por gérmenes susceptibles como *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* (Arrijoja-Dechert, 2002).

Caprino y ovino: En infecciones del tracto respiratorio causadas por gérmenes susceptibles como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (Arrijoja-Dechert, 2002).

Porcino: En infecciones del tracto respiratorio causadas por gérmenes susceptibles, incluido *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *Salmonella choleraesuis* y *Streptococcus suis* tipo 2 (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003).

Equino: infecciones del tracto respiratorio causadas por gérmenes susceptibles, incluyendo *Streptococcus zooepidermicus* (Arrijoja-Dechert, 2002), tanto en potros como en caballos adultos. En potros con septicemia este antibiótico resulta eficaz (Hall y cols., 2014). La perfusión intravenosa regional con altas dosis de ceftiofur puede ser una terapia adyuvante beneficiosa en el tratamiento de infecciones sinoviales en equinos que son causadas por microorganismos susceptibles e esta cefalosporina (Pille y cols., 2005).

Perro: En infecciones del tracto urinario causadas por gérmenes susceptibles, incluyendo *E. coli*, *P. mirabilis* y *S. aureus* (Arrijoja-Dechert, 2002, USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003).

En otros casos no está establecida la eficacia y la seguridad del ceftiofur, como ocurre en el tratamiento de infecciones no urinarias en el perro. Sin embargo, basándose en los parámetros farmacocinéticos y la susceptibilidad de las bacterias, parece existir un buen margen de seguridad del ceftiofur en el tratamiento de infecciones causadas por gérmenes susceptibles en hueso, aparato respiratorio, piel y tejidos blandos (Brown y cols., 1995) en esta especie.

Igual ocurre en potros, donde los estudios realizados permiten sospechar que existe una buena seguridad en el uso del ceftiofur en el tratamiento de infecciones causadas por gérmenes susceptibles en hueso, articulaciones, aparato respiratorio, piel, tejidos blandos y tracto urinario (Meyer y cols., 2009) y con septicemia (Hall y cols., 2011).

Según las fichas técnicas de CEFENIL RTU® y de Excenel evo® 50 mg/mL, suspensión inyectable para porcino y bovino (ceftiofur), está autorizado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitario (AEMPS) para el tratamiento de infecciones bacterianas en bovino y porcino causadas por microorganismos grampositivos y gramnegativos sensibles.

Bovino: Enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Histophilus somni* (Brown y cols., 2006). Necrobacilosis interdigital aguda (panadizo) asociada a *F. necrophorum* y *B. melaninogenicus*. Metritis postparto, tras 10 días después del parto, asociada con *E.coli*, *Arcanobacterium pyogenes* y *F. necrophorum*, sensibles a ceftiofur, cuando el tratamiento con otro antimicrobiano haya fracasado.

Porcino: Infecciones bacterianas del tracto respiratorio producidas por *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis*. Sin

embargo, en un estudio en el que se investigaron las actividades del ceftiofur, penicilina, enrofloxacin, florfenicol, tetraciclina, tilmicosina y tulatromicina contra los patógenos respiratorios porcinos *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en los Estados Unidos y Canadá entre 2001 y 2010 (Portis y cols., 2013).

Durante el estudio se analizaron un total de 1097 aislados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 2389 de *Pasteurella multocida* y 2617 de *Streptococcus suis* aislados de cerdos enfermos o muertos de América del Norte durante un período de 10 años. Se determinó la sensibilidad in vitro a los agentes antimicrobianos aprobados para el tratamiento de las enfermedades respiratorias porcinas (SRD).

Este informe proporciona la primera encuesta amplia de la sensibilidad a los antimicrobianos de los patógenos respiratorios más importantes aislados de cerdos en los Estados Unidos y Canadá durante los años 2001 a 2010. Los datos muestran que, durante los 10 años, *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida* permanecieron susceptibles al ceftiofur, la enrofloxacin, el florfenicol, la tilmicosina y la tulatromicina mientras que *S suis* permaneció susceptible al ceftiofur, enrofloxacin y florfenicol. También se observaron valores bajos de CMI para penicilina para *P. multocida* y *S suis* y valores más altos de CMI para *A pleuropneumoniae*. La mayoría de los aislados de los tres organismos fueron resistentes a la tetraciclina durante los 10 años del estudio.

Los datos presentados en este informe, en especial los datos que muestran que ha habido un cierto aumento de la CMI de importantes agentes antimicrobianos, debe servir para subrayar la importancia del uso prudente de estos fármacos en el tratamiento las enfermedades respiratorias porcinas y otras infecciones.

2.11.4.- POSOLOGÍA, FORMA DE ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO.

Según las fichas técnicas del medicamento CEFENIL RTU® y Excenel evo® 50 mg/mL, suspensión inyectable para porcino y bovino de la AEMPS, la posología, forma de administración y duración del tratamiento de ceftiofur es:

Ganado porcino:

- 3 mg de ceftiofur/kg de peso vivo/día por vía intramuscular durante 3 días. No debe administrarse más de 4 mL por punto de inyección.

Ganado bovino:

- Infecciones respiratorias: 1 mg de ceftiofur/kg de peso vivo/día durante 3 a 5 días mediante inyección subcutánea.

- Panadizo interdigital: 1 mg de ceftiofur/kg de peso vivo/día durante 3 días mediante inyección subcutánea.

- Metritis aguda post-parto en los 10 días después del parto: 1 mg/kg peso vivo/día durante 5 días consecutivos por inyección subcutánea. No debe administrarse más de 13 mL por punto de inyección (Okker y cols., 2002).

Las inyecciones subsiguientes, en ambas especies, deben administrarse en diferentes puntos.

- En un estudio de Dueger y cols. (2004), se concluye que una dosis única de ceftiofur en forma de ácido libre cristalino, administrado tras la oreja, resulta eficaz frente a la queratoconjuntivitis infecciosa bovina con ulceración corneal.

- Estudios realizados por Hibbard y cols. (2002), demostraron que una dosis única de 4,4-5,5 mg/kg de CCFA, administrada por vía SC en el cuello es un eficaz en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina (BRD) en ganado de engorde. Sin embargo, esta vía de administración no debe ser considerada para esta formulación debido a los residuos de ceftiofur que están presentes en el lugar de la inyección durante largos períodos de tiempo.

En otras especies, en su *uso no contemplado*, las dosis recomendadas en países en los que está registrado son las siguientes:

Ovino/caprino: 1.1-2.2 mg/kg IM cada 24h, durante tres días consecutivos. En animales en lactación se aconseja el límite superior de la dosis recomendada. (Naxcel®)

Equino:

- ✓ 2.2-4.4 mg/kg (volumen máximo por punto de administración 10 mL) IM cada 24h, sin superar los 10 días de tratamiento (Naxcel®).
- ✓ 1-2 mg/kg/12h IV o IM (Plumb, 2010).
- ✓ En la enfermedad de Lyme, 2.2-4.4 mg/kg IV cada 12h mediante catéter (Plumb, 2010).
- ✓ En paperas, 2.2 mg/Kg IM cada 12-24h, en el curso temprano de la infección, cuando sólo se presenta fiebre y depresión. Si hay linfadenopatía no tratar (Plumb, 2010).
- ✓ Ceftiofur tiene una excelente actividad sobre las bacterias responsables de la placentitis en yeguas, pudiendo utilizarse a dosis de 2,2-4,4 mg/kg (Macpherson y cols., 2014).
- ✓ En potros: 2.2-4.4 mg/kg IV o IM cada 12-24h (Plumb, 2010) o 2.2-5 mg/kg IM cada 12h (Plumb, 2010). En septicemia: ceftiofur sódico a 5 mg/kg o ácido libre cristalino de ceftiofur a 6,6 mg/kg, en ambos casos por vía SC (Hall y cols., 2011).

Caninos:

- ✓ En infecciones urinarias por gérmenes susceptibles, 2.2 mg/kg cada 24h SC, durante 5-14 días (Naxcel®).
- ✓ 10 mg/kg, cada 12-24h, SC (Plumb, 2010).
- ✓ En infecciones de tejidos blandos, 2.2 mg/kg/12h o 4.4 mg/kg/24h SC, durante 5-14 días (Plumb, 2010).
- ✓ En sepsis y bacteriemia, 4.4 mg/kg/12h SC, durante 5días (Plumb, 2010).
- ✓ En septicemia neonatal, 2.5 mg/kg/12h SC, durante no más de 5 días (Plumb, 2010).

Felinos:

- ✓ En infecciones urinarias, 2.2 mg/kg SC cada 24 h, durante 5-14 días.
- ✓ En infecciones de tejidos blandos, 2.2 mg/kg/12h o 4.4 mg/kg/24 h, SC durante 5-14 días (Plumb, 2010).
- ✓ En sepsis y bacteriemia, 4.4 mg/kg/12h SC, durante 5 días (Plumb, 2010).

Aves:

- ✓ En pavitos, 0.17-0.5 mg por animal y en pollitos, 0.08-0.2 mg/pollito, SC en el cuello (Naxcel®).
- ✓ En ráticas o aves corredoras: 10-20 mg/kg/12h, IM (Plumb, 2010).

Reptiles:

- ✓ En neumonías bacterianas susceptibles, 2.2 mg/kg/24 h IM, manteniendo al animal en su extremo superior de temperatura ideal (Plumb, 2010).
- ✓ En iguanas verdes, para gérmenes susceptibles a > 2 mcg/mL, 5 mg/kg, IM o SC, cada 24 h (Plumb, 2010).
- ✓ En quelonios, 4 mg/kg IM, cada 24 h durante 2 semanas, corrientemente en infecciones respiratorias (Plumb, 2010).

Elefante asiático: En hembras, 1.1 mg/kg IM, cada 8-12 h o 1.1 mg/kg IV cada 24h, dependiendo de la CMI del patógeno (Plumb, 2010).

Gamo: dosis de 3.65 ± 0.1678 mg/kg, IM, cada 12 h permiten mantener concentraciones plasmáticas por encima de la CMI₉₀ en infecciones asociadas con *F. necrophorum*, *P. multocida*, y *S. suis*, además de las ocasionadas por otras bacterias susceptibles.

2.11.5.- TIEMPO DE ESPERA.

Para Excenel evo® 50 mg/mL, suspensión inyectable para porcino y bovino, la ficha técnica indica esperar 2 días para carne de porcino y 6 días para carne de bovino. En leche de vacas lactantes el tiempo de espera es de cero días.

2.11.6.- REACCIONES ADVERSAS.

El ceftiofur presenta, en general, una baja toxicidad dando lugar a reacciones adversas poco importantes y que aparecen con baja frecuencia. Su toxicidad aguda oral e intramuscular son bajas (DL_{50} en ratas de 7760 mg/kg y entre 2156 y 1250 mg/kg, respectivamente). En ratas, no afecta a la fertilidad ni en machos ni en hembras, tras tres generaciones sucesivas recibiendo dosis superiores de 1000 mg/kg diarias. Tanto en rata como en ratón no ha resultado ser teratogénico (EMA Ceftiofur Summary report 1).

En bovino, no se han observado signos de toxicidad sistémica después de elevadas sobredosificaciones por vía parenteral. Puede ocasionar dolor en el punto de administración parenteral y, en la administración SC en el cuello, pueden aparecer zonas coloreadas que podrían persistir hasta más de 5 días. Además, según la ficha técnica de Excenel evo[®], pueden ocurrir reacciones de hipersensibilidad no relacionadas con la dosis. Ocasionalmente pueden ocurrir reacciones alérgicas (por ejemplo reacciones de piel, anafilaxia). En bovinos, se ha observado edema e hinchazón en el punto de inyección después de la inyección subcutánea del antibiótico. Se puede producir una inflamación crónica local de leve a moderada en la mayoría de los animales hasta 42 días después de la inyección.

En cerdos, administrando ceftiofur sódico a dosis 8 veces superiores a la dosis diaria recomendada, intramuscularmente durante 15 días consecutivos, no aparecen signos de toxicidad. En estos animales se han observado reacciones leves en el punto de inyección, tales como decoloración de la fascia o de la grasa, en algunos animales durante los 20 días posteriores a la inyección.

En diversas publicaciones, se indica que las cefalosporinas están desaconsejadas en roedores y conejos, ya que ocasionan con frecuencia disbiosis

intestinales con aparición de diarrea y deshidratación. Particularmente cuando se administran por vía oral y a dosis elevadas.

En el caballo, la diarrea es una reacción adversa que debe vigilarse, sobre todo cuando antes de la administración se encuentra estresado (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003; Barr y cols., 2013). Sin embargo, tras la administración de dosis de 4 mg/kg IM en caballo, tuvo mínimos efectos adversos (Plumb, 2010). Otros autores señalan que tras la administración de hasta cinco veces la dosis recomendada (11mg/kg), durante 30 días, se produce un aumento del número de neutrófilos, de la concentración plasmática de fibrinógeno y de los niveles de aspartato transaminasa y creatinquinasa, así como alteraciones en el leucograma (Mahrt, 1992). La reacción adversa más frecuente tras la administración IM en forma ácido libre cristalino en caballos se limita al punto de administración, con aparición de edema e hinchazón, con una frecuencia del 3,6% (Giguère, 2008).

En potros, en los que se administró ceftiofur sódico y en forma de ácido libre cristalino, no se observaron efectos adversos atribuidos a la administración de estos fármacos (Hall También se destaca que el ceftiofur puede causar en todas las especies, reacciones de hipersensibilidad (reacciones anafilácticas, angioedemas, agranulocitosis, fiebre, enfermedad del suero, urticaria) (Papich, 1984; Davis, 1984). En el perro, se ha descrito la aparición de anemia y trombocitopenia, cuando se administra ceftiofur a dosis elevadas (de tres a cinco veces la dosis recomendada) o durante largos periodos de tiempo (5 o 6 semanas). Estas RRAA son reversibles y desaparecen al interrumpir el tratamiento (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003).

La seguridad reproductiva del ceftiofur no ha sido investigada específicamente en cerdas o vacas preñadas.

2.11.7.- INTERACCIONES CON MEDICAMENTOS.

Aunque en las fichas técnicas de los medicamentos (CEFENIL RTU[®], CEFENIL 50mg/ml Polvo y disolvente para solución inyectable para bovino y porcino[®], EXCENEL Evo[®]) se dice que *no se han detectados interacciones de ceftiofur con otros fármacos, pero debido a interacciones farmacodinámicas, no se debe administrar simultáneamente con antibióticos bacteriostáticos*, se han documentado algunas RRAA con otras cefalosporinas de tercera generación (cefaloridina) que quizá podrían presentarse con el ceftiofur, como es el aumento de la nefrotoxicidad cuando se asocia a aminoglucósidos.

Sweeney y cols. (2008), estudiaron las actividades de dos antibacterianos utilizados frente a *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* responsables de infecciones respiratorias bovinas, tulatromicina y ceftiofur, solos, en combinación uno con el otro y en combinación con cada uno de los siguientes siete antibióticos, tilmicosina, florfenicol, enrofloxacin, danofloxacin, ampicilina, tetraciclina, y penicilina G. En general, *in vitro*, la tulatromicina y ceftiofur, en combinación con cada uno de los otros siete antimicrobianos, producen principalmente una respuesta indiferente sin ocurrencias de sinergismo y raros casos de antagonismo.

En un ensayo de campo aleatorio controlado para evaluar los efectos de los dos conjuntos de estrategias de tratamiento de la resistencia con ceftiofur y tetraciclina a la en el ganado de engorde (Kanwar y cols., 2013), se comprueba que la clortetraciclina puede exacerbar la resistencia al ceftiofur y, por lo tanto, deben ser evitado su administración en animales que a los que se les administró previamente ceftiofur, especialmente cuando se considera su uso en secuencia.

2.11.8.- PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.

El ceftiofur se absorbe pobremente tras su administración oral, sin embargo su absorción es rápida cuando se administra por vía intramuscular. En todas las especies, se metaboliza rápidamente a desfuroilceftiofur y ácido furoico.

El ceftiofur se une en un alto porcentaje a las proteínas plasmática en animales adultos, al contrario que otras cefalosporinas (por ejemplo, cefquinoma se une a proteínas en menos del 5%), y esto ocasiona que su distribución difiera a la de otras cefalosporinas (USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs, 2003). También lo hace el metabolito principal de ceftiofur, desfuroilceftiofur, que tiene un grupo sulfhidrilo que forma enlaces covalentes reversibles con las proteínas plasmática plasma y de los tejidos (Jaglan y cols., 1994).

Se alcanzan concentraciones máximas (ceftiofur + metabolitos) entre las 0,5 y 2 horas tras la administración. Las concentraciones libres de ceftiofur, y de su metabolito activo, tienden a ser más bajas de lo esperado cuando se administran dosis eficaces en el tratamiento de una enfermedad, posiblemente debido a su elevada capacidad de unión a proteínas plasmáticas (Jaglan y cols., 1994). Sin embargo, las concentraciones de ceftiofur y de metabolito activo en cámaras de tejido infectadas con *Pasteurella* implantadas en ganado bovino, tienden a ser mayores que las concentraciones obtenidas en cámaras de tejido no infectadas (Clarke y cols., 1996). Debido al transporte con estas proteínas, el metabolito se concentra en un punto de la infección, es activo y se mantiene activo en presencia de tejido necrótico y detritus celulares. En un estudio realizado en patos de 25 días (Chung y cols., 2007) que recibieron, por vía SC, dosis de ceftiofur sódico de 2 y 4 mg/kg, las concentraciones de desfuroilceftiofur en el primer día de administración fueron inferiores a 0.05 mcg/g de ceftiofur libre equivalente en todos los tejidos, excepto en riñón, después del tratamiento con 2 mg/kg. En el segundo día después de la administración a la dosis de 4 mg/kg, no se

detectó desfuroilceftiofur en ningún tejido a pesar de que se detectó en todas las muestras en el primer día.

El efecto de la infección por *Mannheimia haemolytica* en la penetración de ceftiofur y desfuroilceftiofur en cámaras de tejido se estudió terneros, tras la administración subcutánea de ceftiofur ácido libre cristalino (Washburn y cols., 2005). Las concentraciones en el plasma de ceftiofur y desfuroilceftiofur y en la cámara de fluido de tejido mantenido por encima de un umbral de 0,2 µg/mL durante al menos 8 días. Las concentraciones de ceftiofur y desfuroilceftiofur en el fluido de la cámara infectada fueron significativamente más altas que las del fluido de la cámara no infectada. Estos resultados indican que una sola administración subcutánea de ceftiofur ácido libre cristalino en 6,6 mg / kg se puede esperar para proporcionar una terapia eficaz de infecciones bacterianas sensibles durante un período de al menos 1 semana.

El ceftiofur no metabolizado desaparece del plasma a las 2-4 horas tras la administración. Más del 95% de la dosis administrada desaparece dentro de las primeras 24 horas tras su administración. El 60-80% del mismo lo hace a través de la orina y el resto con las heces, mayoritariamente metabolizado (EMA Ceftiofur Summary report 1). La eliminación se realiza principalmente a través de la orina (más del 70%, en porcino y más del 55% en bovino), mediante secreción tubular y/o filtración glomerular. El probenecid no altera la excreción renal del ceftiofur (Whittem y cols., 1995). La recuperación media del medicamento en heces fue del 12 al 15%, en porcino y del 31% en bovino (ficha técnica excenel®).

En un estudio en el que se administraba por vía IM tres dosis diarias de clorhidrato de ceftiofur de 6,76 - 4,41 mg/kg, a las 12 horas se excretó el 91,44% (72,51% en la orina; 12,63% en las heces), y el 100,35% (82,48% en la orina; 12,85% en las heces), respectivamente. En los diferentes tejidos analizados, las concentraciones más altas se obtuvieron en los riñones (10.68 y 6.33 g-CFAE/g para la dosis de 6.76 y

4.41, respectivamente), seguidos por los sitios de inyección, los pulmones, el hígado y el músculo (Beconi-Barker y cols., 1996).

No se ha observado acumulación de desfuroilceftiofur tras la administración de una dosis de 3 mg/kg/día durante 3 días en cerdos ni después del tratamiento diario durante 5 días en bovino.

En cuanto a la excreción a través de la leche, cuando se administra sistémicamente en las dosis recomendadas, su acceso es demasiado bajo para producir residuos superiores a las tolerancias reglamentarias establecidas (Erskine y cols., 1995), con poco o ningún paso hacia la leche, inclusive de origen caprino (Doré y cols., 2011). Sin embargo, la ausencia del paso a leche tanto del ceftiofur como su metabolito (desfuroilceftiofur) está influenciada por la elevada unión a proteínas del plasma que presentan (Erskine y cols., 1995 y 1996). Existen evidencias que sugieren que los animales que producen un menor volumen de leche tienen una eliminación más lenta de los fármacos administrados IM, que los animales que producen mayores volúmenes de leche; esta correlación fue demostrada en los trabajos de Whittam (1999) con pirlimicina y de Smith y cols. (2004) con ceftiofur, en vacunos. Esto es debido a que en igualdad de dosis, los animales que producen un mayor volumen de leche, tienen mayor capacidad de vaciar su glándula mamaria, eliminando la leche en menor tiempo que los animales de menor producción.

- CAPRINO

En cabras lecheras, dosis de 1.1-2.2 mg/kg, IM, producen una biodisponibilidad del 100% y se obtienen semividas ($t_{1/2}$) de 163 y 156 minutos, respectivamente; en tanto que la administración intravenosa de esas mismas dosis generan semividas de 172 y 233 min. (Courtin y cols., 1997). En el mismo estudio, se obtuvo, tras la administración intravenosa de una dosis de 2,2 mg/kg, una semivida de 254 min en cabras no lactantes. El aclaramiento (CL) que se obtuvo fue de 1,38 mL/kg/h y de 1,11 mL/kg/h en cabras lactantes y no lactantes, respectivamente.

A la dosis de 2,2 mg/kg, tras la administración intravenosa en cabras (Errecalde y cols., 2006), indican una semivida de 1,63 h, Vss y Vz de 0,38 L/kg y 0,48 L/kg y un aclaramiento de 3,3 mL/kg/min. Estos mismos autores, tras la administración intramuscular de la misma dosis de esta cefalosporina en los mismos animales, obtienen una concentración máxima (Cmax) de 3,6 µg/mL y un tiempo máximo (Tmax) de 0,53 horas.

En esta especie se ha estudiado la farmacocinética de la forma libre cristalina, por vía subcutánea, a dosis de 6,6 mg/kg, tanto en cabras lecheras como en no lecheras (Doré y cols., 2010). Estos autores obtuvieron, respectivamente, valores de Cmax de 1,45 µg/mL y 2,2 µg/mL, valores de semivida de 36,9 h y 41,5 h y valores de Vss de 2,9 L/kg y 2,8 L/kg.

- OVINO

En estudios realizados con ceftiofur, administrado por vía subcutánea en forma de ácido libre cristalino, en ganado ovino a dosis de 6.6 mg/kg, se alcanzaron concentraciones máximas de 2450 µg/L a las 23,11 h (Rivera-García y cols., 2014). En otros estudios, con ceftiofur sódico, por vía intramuscular en el que la dosis fue de 2,2 mg/kg se alcanzaron concentraciones máximas de 1,290 µg/mL a los 10,8 minutos (Tmax) (Craigmill y cols., 1997) y Cmax de 4,1-6,2 µg/mL a los 30 minutos.

- PORCINO

En cerdos, tras la administración de una dosis intramuscular de 3 mg/kg de peso vivo (p.v.) se alcanzó la máxima concentración plasmática de $11,8 \pm 1,67$ µg/mL al cabo de 1 hora; la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) del metabolito principal es de $16,7 \pm 2,3$ horas en cerdos. Ceftiofur tiene una biodisponibilidad completa después de su administración por vía intramuscular (Ficha técnica CEFENIL RTU®).

Brown y cols. (1999), realizan un estudio no compartimental del ceftiofur sódico en esta especie, tras la administración intramuscular de 3 mg/kg, y obtienen valores de Cmax y Tmax de 15,8 µg/mL y 0,5-4 horas. Con la forma hidroclorehidrato, obtienen una Cmax de 11,8 µg/mL y una Tmax de 1-4 horas. Las semividas reportadas, para la sal sódica y el hidroclorehidrato son, respectivamente, 14,3 h y 16,5 h.

- BOVINO

Después de la administración de una única dosis subcutánea de 1 mg/kg de peso vivo en bovinos, se alcanzó la máxima concentración plasmática de $2,85 \pm 1,11$ µg/mL 2 horas después de la administración. En vacas sanas, se alcanzó en el endometrio una Cmax de $2,25 \pm 0,79$ µg/mL 5 ± 2 horas después de una administración única. Las concentraciones máximas en carúncula y loquios de vacas sanas fueron $1,11 \pm 0,24$ µg/mL y $0,98 \pm 0,25$ µg/mL, respectivamente. Ceftiofur tiene una biodisponibilidad completa después de su administración por vía subcutánea (Brown y cols., 2006; Ficha técnica CEFENIL RTU®).

La semivida del ceftiofur resultó parecida a la de otros betalactámicos administrados IM en vacas lactantes, siendo sus valores de $6,7 \pm 2,07$ h (Smith y cols., 2004). La vida media de eliminación del desfuroilceftiofur en bovinos es $11,5 \pm 2,57$ horas (Ficha técnica CEFENIL RTU®).

Otros estudio en vacuno son los de Navarre y cols. (1999), que tras administrar 500 mg/animal por vía intramuscular, obtienen una Cmax de 5,6 µg/mL, un Tmax de 0,73 h y una semivida de 16 minutos y los de Whitten y cols. (1995), que tras administrar 2 mg/kg IM en vacas, obtienen una Cmax de 4,6 µg/mL y una Tmax de 60 min. Halstead y cols., (1992), en terneros, administran por vía intramuscular 2,2 mg/kg de ceftiofur y obtienen una Cmax de 8,8 µg/mL y una Tmax de 120 min.

- EQUINO

La absorción del ceftiofur sódico, tras la administración intramuscular, en caballos adultos es rápida, con un valor de Tmax de 1.25 ± 0.46 h (Jaglan y cols., 1994).

Collard y cols. (2011), tras la administración intramuscular de ceftiofur sódico a dosis de 6,6 mg/kg, obtienen C_{max} de 0,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a las 25,5 h (T_{max}). Reportan, además, una semivida de 81 horas y un CL de 81,4 mL/h/kg. En estos animales, la administración subcutánea e intramuscular de ceftiofur ocasiona perfiles farmacocinéticos y picos de concentración similares (Slovis y cols., 2006). Tras la administración intramuscular de ceftiofur a la dosis de 6,6 mg/kg, la C_{max} es más baja ($890 \pm 80 \text{ mg}/\text{mL}$) y el T_{max} es mucho más largo (mediana de 25,5 horas, con un rango 16,7-34,3 horas). La administración intramuscular de ceftiofur sódico a dosis de 2.2 mg/kg cada 24 horas durante 10 días consecutivos, ocasiona concentraciones medias de $4.27 \pm 26 \mu\text{g}/\text{mL}$, con un T_{max} de 1 hora.

En potros se han obtenido un aclaramiento de 74,4 mL/h/kg y un tiempo medio de residencia (MRT) de 9,75 horas (Meyer y cols., 2009). Hall y cols. (2011), en un estudio evaluaron la administración IV y SC de ceftiofur sódico (5 mg/kg) y la administración SC de ácido libre cristalino de ceftiofur (6,6 mg/kg) en potros sanos. Los parámetros farmacocinéticos (media \pm SD) no compartimentales, para IV y SC de ceftiofur sódico fueron: AUC: $86,4 \pm 8,5$ y $91 \pm 22 \text{ h}\cdot\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; la semivida: $5,82 \pm 1,00$ y $5,55 \pm 0,81 \text{ h}$, respectivamente); C_{max} : $13 \pm 1,9 \text{ mg}/\text{mL}$ (SC); T_{max} : $0,75 \pm 0,4 \text{ h}$ (SC). Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales que obtuvieron para SC ceftiofur ácido libre cristalino fueron: AUC: ($139,53 \pm 22,63 \text{ h}\cdot\text{g}/\text{mL}$), semivida: $39,7 \pm 14,7 \text{ h}$; C_{max} : $2,52 \pm 0,35 \text{ mg}/\text{mL}$; y t_{max} : $11,33 \pm 1,63 \text{ h}$.

En ponis hembras, a dosis de 4,4 mg/kg por vía intramuscular, ocasiona una C_{max} de 8.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Van den Berg, 2014).

- OTRAS ESPECIES

Camello (Goudah, 2007).- Tras la administración IV e IM de 2,2 mg/kg, se obtiene unas semividas de 3,18 y 3,29 horas y valores de MRT de 3,68 y 5,21 horas, respectivamente. El valor de CL es de 300 mL/h/kg, el del V_{ss} de 0,13 L/kg, una C_{max} de 10,34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un T_{max} de 1,2 horas. La biodisponibilidad IM es del 97,4%.

Llamas (Drew y cols., 2004a).- Tras la administración IM de 2,2 mg/kg, se obtiene una semivida de 8 horas. El valor de CL/F es de 61,8 mL/h/kg, el del Vss de 0,61 L/kg, una C_{max} de 5,8 µg/mL y un T_{max} de 0,73 horas. La semivida de absorción es de 0,27 h.

Alpacas (Drew y cols., 2004a).- Tras la administración IM de 1 mg/kg, se obtiene una semivida de 5,6 horas, un valor de MRT de 6,8 horas, un valor de CL/F es de 81,6 mL/h/kg y un valor de Vss de 0,54 L/kg. La semivida de absorción es de 0,16 h.

Ciervo (Drew y cols., 2004b).- Tras la administración IM de 2,7 mg/kg, se obtiene una semivida de 23 horas, un valor de Vss de 1,67 L/kg, una C_{max} de 3,98 µg/mL y un T_{max} de 0,54 horas. La semivida de absorción es de 0,16 h.

Gamo (Kottwitz y cols., 2015).- Tras la administración IV de ceftiofur a la dosis de 3.65 ± 0.1678 mg/kg en gamo, se obtuvo una semivida de 178.36 (19.75–217.22) min. El Vss fue de 0.171 (0.101–0.229) L/kg y el CL de 0.97 (0.48–4.3) mL/min kg. Tras la administración IM, de la misma dosis, la C_{max} fue de 14.37 (9.00–32.00) µg/mL a los 54.5 (11.00–95.00) min. La semivida y el MRT fueron de 128.32 (38.03–242.40) y 203.65 (62.48–347.15) min, respectivamente. La semivida de absorción fue de 14.77 (–57.74 to 94.79) min, y la biodisponibilidad del 78.0 % (58.00–137.00).

León marino (Meegan y cols., 2013).- Tras la administración de la forma de ácido libre cristalina, por vía intramuscular, a la dosis de 6,6 mg/kg, se obtiene una C_{max} de 3,6 µg/mL y un T_{max} de 24h, una semivida de 60,8 h y un V/F de 2,16 mL/kg.

Iguana (Benson y cols., 2003).- Tras la administración SC de 5 mg/kg, se obtiene una semivida de 15,5 horas, una C_{max} de 18,9 µg/mL y un T_{max} de 38 minutos.

Pollos (El-Sayed y cols., 2015).- La farmacocinética del ceftiofur ha sido estudiada en pollos, tras su administración IV e IM (dosis única y repetidas). Tras la

administración IV, a dosis de 10 mg/kg, las curvas de concentración plasmáticas se ajustaban a un modelo bicompartimental, con una semivida de 5,47 horas, un Vss de 198,6 mL/kg y un CL de 0,345 mL/kg/min. Tras la administración IM, se obtuvo una Cmax de 25,94 µg/mL y un Tmax de 2,51 horas. La biodisponibilidad fue de 88,9%.

3.-MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.-MATERIAL.

Los productos, reactivos, materiales, aparatos y software utilizados para la realización del presente trabajo, se relacionan a continuación:

3.1.1.-MATERIAL FUNGIBLE.

- Agujas hipodérmicas.
- Tubos de extracción sin anticoagulante.
- Sistema Vacutainer®
- Tubos de ensayo de varias capacidades.
- Micropipetas de varias capacidades Gilson®.
- Puntas para micropipetas de varias capacidades
- Pipeta repetidora HandyStep®.
- Puntas de desplazamiento directo codificadas de varias capacidades Plastibrand®.
- Matraces aforados de varias capacidades.
- Matraces Erlenmeyer de varias capacidades.
- Placas de Petri de 10 cm de diámetro.
- Placas de poli-estireno de 96 celdillas.
- Vasos de precipitado de varias capacidades.
- Viales con tapón para autoinyector 8 x 40, 1 mL, Wheaton, USA.
- Filtros Millipore® tipo HV 0.45 µm de diámetro de poro.
- Tubos Eppendorf 1,5 y 2 mL.
- Cartuchos para extracción en fase sólida Oasis HLB (60mg/3mL) Waters.

3.1.2.- PRODUCTOS Y REACTIVOS.

- Agua bidestilada.
- Ácido trifluoroacético (Lote: 0000457268, Panreac Química, Barcelona).

- Acetonitrilo HPLC (Lote: SZBE017SV, Sigma-Aldrich, Madrid).
- Agua para HPLC (Lote: BCBN4854V, Sigma-Aldrich, Madrid).
- Metanol para HPLC (Lote: SZBD0145SV, Sigma-Aldrich, Madrid).
- Ceftiofur hidrocloreuro (Lote: SZBC024XV, Fluka, 97,6% de pureza; Lote: SZBA208XV, Sigma-Aldrich, 98,5% de pureza)
- Ceftiofur (EXCENEL® 4g Ceftiofur sódico polvo estéril de Lab. Pfizer)
- Cefotaxime (Lote: QVP5H, TCI, >97% de pureza)
- Polímero P407 (BASF, Alemania).
- Carboximetilcelulosa (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).
- Fosfato monosódico (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).
- Fosfato disódico (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).
- Heparina sódica 5% (Mayne Pharma, España).
- Agar Mueller-Hinton II (Beckton Dickinson).
- Mueller-Hinton II de crecimiento (Beckton Dickinson).
- Triptona soya agar (Oxoid)
- Placas de petri de agar sangre de carnero con un 5% en placa (Oxoid)

3.1.3.- APARATAJE.

- Agitador magnético SBS A-06.
- Agitador de tubos Heidolph Reax 2000.
- Balanza de precisión Mettler Toledo AB135-5/FACT, pesada entre 0.0001 y 120 g.
- Campana de flujo laminar vertical micro-V (Telstar).
- Centrífuga MIKRO modelo 120.
- Congelador Sanyo MDF (- 45 °C).
- Replicador de inóculos Steers (Craft Machine, Inc, Cherter, Pa).
- Estufa Selecta.

- Refrigerífico Electrolux® modelo ER 3818C.
- Neveras portátiles isotérmicas.
- Mechero Bunsen.
- Ordenador personal Intel core i5.
- pHmetro Crison Digit 501.
- Neveras portátiles isotérmicas.
- Horno microondas Goldstart, modelo MA-894DD.
- Termómetro de mercurio.
- HPLC modelo JASCO, compuesto de:
 - Bomba cuaternaria modelo PV-1585.
 - Detector de ultravioleta modelo UV-1575.
 - Autoinyector modelo AS-950.
 - Desgasificador DG-1580-53.
 - Módulo mezclador LG-2080-04.
 - Horno para columnas Peltier JetStream.
 - PC con el programa ChromPass Chromatography Data System.
 - Columnas ULTRABASE 100 Å 5µm, 250 mm x 4,6 mm.
 - Precolumnas Tracer Excel ODS (C18) TECNOKROMA 10 x 3.2 mm.

3.1.4.- SOFTWARE INFORMÁTICO.

- Programa de análisis farmacocinético Winnonlin Professional® versión 5.0.
- Paquete de análisis estadístico SPSS® versión 19.0.
- Programa de gráficos SIGMAPLOT® versión 12.3.
- Procesador de textos Microsoft® Word 2007 y Hoja de cálculo Microsoft® Excel 2007.

3.2.- ANIMALES.

El estudio se realizó en 6 cabras, todas ellas sanas, adultas y de raza Murciano/granadina cuyos pesos oscilaban entre los 40,5 y 56 Kg. Los animales tenían entre 2,5 y 3,5 años de edad y procedían de la Granja Veterinaria de la Universidad de Murcia. Durante el período de estudio se controló el estado sanitario para asegurar la ausencia de enfermedades infecciosas y/o parasitarias y no recibieron ningún fármaco durante, al menos, 15 días antes del inicio de la experiencia. Los animales seleccionados fueron separados del resto del grupo en un corral contiguo, para facilitar su manejo y se identificaron asignándoles su letra en el collar. Se alimentaron a base de pienso y heno de alfalfa y tuvieron acceso al agua de bebida *ad libitum*.

3.3.- MEDICAMENTOS.

Se han empleado diferentes formulaciones de ceftiofur, una formulación convencional de uso comercial (EXCENEL®, Pfizer) para la administración por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) y otra formulación de liberación controlada en forma de gel acuoso preparada por nosotros con un 25 % (p/v) de Polaxamer 407 (P407) a la que se adiciona como coadyuvante un 2 % de carboximetilcelulosa (P407-CMC) también para su administración por vía subcutánea (SC2).

La formulación controlada se ha preparado siguiendo el método de Schmolka (1972) modificado por nosotros, de tal forma que se prepara en forma de una solución acuosa que modifica su estado en función de la temperatura manteniéndose en disolución a bajas temperaturas y gelificando a la temperatura corporal. En la preparación de la formulación P407-CMC (SC2) se añadía una cantidad suficiente de carboximetilcelulosa además del Polaxamer 407 al agua fría (5°C) y se agitaba suavemente hasta la obtención de una solución clara y transparente (entre 6-12 horas). Una vez formada la disolución acuosa fría del excipiente se añadía ceftiofur puro hasta alcanzar el 5% (p/v) y se agitaba suavemente hasta su completa disolución. Los productos así preparados se mantenían refrigerados a 5°C en forma de solución acuosa clara y transparente.

3.4.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

El antibiótico utilizado fue Ceftiofur sódico. Se administró a dosis de 2 mg/kg en solución acuosa por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) y a dosis de 6 mg/kg por la vía subcutánea en solución de P407 al 30% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

El estudio fue de tipo cruzado en 3 fases, con intervalos entre cada fase de 15 días para asegurar la ausencia de interferencias entre cada uno de los estudios (Tabla 1). Las dosis utilizadas según el peso de cada animal se detallan en la tabla 2.

ANIMAL	IV*	SC ₁ *	SC ₂ *
Cabras	A,B	C,D	EF
Cabras	EF	A,B	C,D
Cabras	C,D	EF	A,B

TABLA 1.- Esquema del diseño cruzado utilizado en la experiencia.

ANIMAL	IV*	SC1*	SC2*
Cabra A (41 kg)	82 mg	82 mg	246 mg
Cabra B (40.5 kg)	81 mg	81 mg	243 mg
Cabra C (51.5 kg)	103 mg	103 mg	309 mg
Cabra D (56 kg)	112 mg	112 mg	336 mg
Cabra E (52 kg)	104 mg	104 mg	312 mg
Cabra F (50 kg)	100 mg	100 mg	300 mg

* Vía intravenosa (IV), vía subcutánea formulación acuosa (SC1), vía subcutánea formulación P407+CMC (SC2)

TABLA 2.- Dosis de antibiótico utilizada según el peso de cada animal.

3.4.1. -ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

La solución acuosa de ceftiofur se administró a cada uno de los animales objetos de estudio en la vena yugular derecha. La dosis administrada fue de 2 mg/kg como dosis única.

Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular izquierda a los siguientes tiempos (desde la administración IV del fármaco) expresados en horas:

0 (blanco)	0,083	0,167	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	4	6	8	10	12	24	36	48
---------------	-------	-------	------	-----	------	---	-----	---	---	---	---	----	----	----	----	----

Tras su obtención, las muestras se llevaron a un frigorífico y se dejaron coagular durante 30 minutos y el suero fue obtenido tras una posterior centrifugación a 1500g durante 10 minutos. Una vez separado el suero, se congeló por duplicado a -45°C, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas y el estudio *ex vivo*.

3.4.2. -ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA.

La administración subcutánea de la solución acuosa de ceftiofur se realizó a nivel escapular, a una dosis de 2 mg/kg para la formulación acuosa y a una dosis de 6 mg/kg para la formulación de P407+CMC, todas como dosis única.

Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular a los siguientes tiempos (tras la administración subcutánea) expresados en horas:

0 (blanco)	0,083	0,167	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	4	6	8	10	12	24	36	48
---------------	-------	-------	------	-----	------	---	-----	---	---	---	---	----	----	----	----	----

Todas las muestras recibieron el mismo tratamiento que las de la administración intravenosa, es decir, tras obtener suero, fueron centrifugadas, separadas y congeladas por duplicado a -45°C hasta su análisis.

Se evaluó el daño de la administración SC, en el punto de administración (previamente, convenientemente depilado), mediante la observación de signos de

dolor por parte del animal, cojera, control de la temperatura dérmica en el punto de la administración, reacciones inflamatorias, formación de induraciones, etc.

3.4.3. - RECOGIDA DE MUESTRAS DE LECHE.

Se estudió la eliminación del ceftiofur y su paso a leche en el grupo de cabras estudiadas. La toma de muestras de leche fue realizada a primera hora de la mañana previa a la administración del fármaco y a los siguientes tiempos (tras la administración del fármaco por las vía IV, SC1 y SC2, mediante evacuación completa de ambas ubres) expresado días:

0 (blanco)	0.5	1	2	3	4	5	6	8	10	12
------------	-----	---	---	---	---	---	---	---	----	----

La producción total de leche recogida fue refrigerada a 4-6 °C antes de congelar dos alícuotas a - 45 °C hasta su posterior procesamiento, a excepción del 1º día de muestreo que se obtendrá el total de leche a las 12 h post-administración.

3.5. - TÉCNICAS ANALÍTICAS.

Para detectar y cuantificar el ceftiofur en suero, leche u otras matrices, existen diversas técnicas analíticas. Las más frecuentes en los estudios farmacocinéticos son la cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* o HPLC) y la microbiológica de difusión en agar, existiendo en general una buena correlación entre los resultados de ambas metodologías (Bergold, 2007,). Sin embargo, con la técnica microbiológica solo se logra caracterizar la actividad antimicrobiana y no al compuesto mismo, por lo que especialmente si tiene metabolitos activos, se sobreestima el valor de algunos parámetros farmacocinéticos (Navarre y cols., 1999; Cester y cols., 1996; McKellar y cols., 1999).

La determinación del ceftiofur no se realiza cuantificando directamente el ceftiofur existente en la muestra, sino al producto obtenido por derivatización del ceftiofur a desfuroylceftiofuracetamida. La técnica analítica (preparación de las muestras, extracción en fase sólida y cuantificación cromatográfica) utilizada ha sido desarrollada

por nosotros a partir de las descritas por Péhourcq y Jarry (1998) y .Jacobson y cols. (2006). Dicha técnica se describe a continuación.

3.5.1.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

En un tubo de vidrio de 13 mL se adicionan, 500 µL de suero/o de interfase de leche (ver el siguiente párrafo), 20 µL de estándar interno o SI (cefotaxime) a una concentración de 200.000 µg/L y 7mL de una disolución 0,4% de dithioerythriol en tampón borato. Se agita durante 10 segundos. Se incuba en un baño orbital durante 15 minutos a 50° C. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 1,5 mL de una disolución al 14% de Iodoacetamida en tampón fosfato pH= 7.0. Se agita en el agitador de tubos durante 10 segundos y se mantiene en agitación y en oscuridad durante 30 minutos. El tubo se envuelve en papel de aluminio y se introduce en agitador IKA. Transcurridos los 30 minutos, el tubo se centrifuga a 3500 rpm durante 3 minutos. El proceso de derivatización ha concluido y a continuación se realiza la extracción en fase sólida (SPE).

En el caso de la leche, previamente, se deposita 1mL de leche que contiene ceftiofur en un tubo eppendorf y se centrifuga a 14.000 rpm durante 20 minutos. A continuación se extraen unos 600 µL de la interfase formada (se forman tres fases: inferior, central y superior), evitando que se mezclen las fases. Para ello, se coge una jeringuilla de insulina y se introduce perpendicular al tubo eppendorf. Los microlitros recogidos son trasvasados a tubos eppendorf.

3.5.2.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Se han utilizado cartuchos Oasis HLB (60mg/3mL) de la empresa Waters. En primer lugar el cartucho se acondicionó, con 1mL de metanol, seguido de 1mL de agua calidad HPLC. A continuación se pasa lentamente la muestra a través del cartucho.

Tras ello se lava con 1mL de una disolución al 5% (V/V) de metanol en agua y se seca el cartucho aplicando vacío durante 10 minutos. La elución de la muestra, se consigue haciendo pasar a través del cartucho 1 mL de una disolución de ácido fórmico/metanol a pH 2,64. La mezcla recogida en el tubo, se deseca en el vacío en el mismo aparato de SPE, durante una hora y media.

Una vez desecada las muestra, se reconstituye con 200 µL de fase móvil inicial, se agita en agitador de tubos y se deposita en un vial microinserto de LC para su posterior inyección en el HPLC.

3.5.3.- CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA.

Se utilizó una técnica de HPLC con elución en gradiente. La separación se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa ULTRABASE C18, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID, 100 Å. y precolumnas ODS (C18) TECNOKROMA 10 x 3.2 mm. Tanto las muestras dentro del autoinyector (sistema Peltier), como la columna fueron termostatazadas a 21°C. Se utilizó cefotaxime como estándar interno (SI).

La fase móvil inicial estaba compuesta por un 90% de ácido trifluoroacético al 0,1% (fase A) y por un 10% de acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 0,1% (fase B).

El gradiente utilizado se muestra en la siguiente tabla:

TIEMPO	% A	% B
0.00	90	10
25.00	75	25
25.10	75	25
28.00	90	10
28.10	90	10
30.00	90	10

La velocidad de flujo fue de 1mL/min (Presión alcanzada 22.0 MPa o Mega Pascales) y el volumen de muestra inyectado al HPLC fue de 100 µL. La detección se realizó mediante detector de ultravioleta (UV) fijado a una longitud de onda de 265 nm. El tiempo de análisis fue de 30 minutos y los tiempos de retención resultaron ser de 12-14 min para el ceftiofur y de 17-19 min para el SI (cefotaxime).

3.6.- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.

3.6.1.- LINEALIDAD.

Las curvas de calibrado se prepararon con 7 concentraciones diferentes de cefquinoma entre 250 y 10000 µg/L (250, 500, 1000, 2000, 4000, 5000, 10000) usando blancos de suero o leche de las cabra. Las curvas estándares (curva patrón) se obtuvieron por representación de concentraciones conocidas de ceftiofur. Cada punto se estableció a partir de un promedio de tres determinaciones. El coeficiente de correlación (r^2) fue siempre $> 0,969\%$ (suero) y $> 0,996\%$ (leche) para todas las curvas de calibrado. Al igual que las muestras experimentales, las alícuotas de suero y leche se almacenaron a $-45\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento.

Las alícuotas de los "controles" fueron procesadas como se describió anteriormente.

3.6.2.- RECUPERACIÓN.

Los porcentajes de recuperación se determinaron comparando las áreas de los picos de los controles con distintas concentraciones conocidas de fármaco (concretamente a 500, 2000 y 5000 µg/L, tanto para le leche como para el suero), con las áreas de los picos de los estándares a las concentraciones correspondientes preparados con agua. Cada punto se estableció a partir de un promedio de tres

determinaciones. Los porcentajes de recuperación de ceftiofur tanto en suero como en leche, se muestran en la Tabla 3:

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	RECUPERACIÓN (%) CEFTIOFUR	
	SUERO	LECHE
500	78,94	84,84
2000	91,76	93,48
5000	83,69	86,18

TABLA 3.- Porcentajes de recuperación de ceftiofur en suero y en leche.

3.6.3.- PRECISIÓN.

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 tres muestras (de suero y leche) repetidas de tres concentraciones estándar (500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$) usadas para las curvas de calibrado, obteniéndose valores de RSD: en suero, < 5,8%, y en leche, < 10,2%. La precisión inter-día se estimó mediante el análisis de tres concentraciones estándar (500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$) durante tres días consecutivos (Tabla 4). Los resultados de precisión expresados como RSD fueron los siguientes: en suero, < 14,3%, y en leche, < 6,5%.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	PRECISION (%) CEFTIOFUR (DESVIACION ESTANDAR RELATIVA)			
	INTRA-DIA		INTER-DIA	
	SUERO	LECHE	SUERO	LECHE
500	3,94	10,20	14,29	6,54
2000	4,11	7,62	1,45	2,64
5000	5,83	4,72	4,91	1,62

TABLA 4.- Porcentajes de desviación estándar relativa de ceftiofur en suero y en leche intra-día e inter-día.

3.6.4. -LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN.

El límite de detección de ceftiofur en suero y leche se ha establecido como la concentración más baja que se ha podido detectar diferenciándola del ruido de fondo del aparato. El límite de detección tanto para suero como para leche fue de 100 µg/L de ceftiofur.

El límite de cuantificación se ha establecido para el nivel de concentración más bajo utilizado en las curvas de calibrado y para el que la desviación relativa estándar es menor al 20%. El límite de cuantificación fue de 250 µg/L tanto para suero como la leche.

3.7.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.

3.7.1.- ANÁLISIS COMPARTIMENTAL DE DATOS PLASMÁTICOS.

Una vez obtenidas las concentraciones de ceftiofur en las muestras de suero a los diferentes tiempos de extracción, se han ajustado dichos datos a los modelos mono y bicompartimental mediante una variante del programa MULTI de Yamaoka y cols. (1981). Los ajustes se han realizado empleando varios tipos de ponderación:

- 1- Inversa de las concentraciones experimentales.
- 2- Inversa de las concentraciones teóricas.
- 3- Inversa de las concentraciones experimentales al cuadrado.
- 4- Inversa de las concentraciones teóricas al cuadrado.

Una vez realizados los ajustes a los diferentes modelos farmacocinéticos, el criterio utilizado para determinar cuál era la ecuación que mejor se ajustaba a los datos observados fue el Criterio de Información de Akaike ó AIC (Yamaoka y cols., 1978a), cuya expresión es:

$$AIC = N \cdot \ln \sum_{i=1}^N (w_i \cdot (C_i' - C_i)^2) + 2p$$

En esta ecuación, N es el número de puntos experimentales y p el número de parámetros del modelo en cuestión. La expresión contenida entre corchetes corresponde a la suma de cuadrados residuales, donde C_i es la concentración obtenida experimentalmente, C_i' es la concentración teórica obtenida a partir de la ecuación correspondiente a ese modelo, utilizando el método de los mínimos cuadrados y W_i es el factor de ponderación. El modelo con el valor mínimo de AIC se considera el óptimo.

3.7.2.- ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL DE DATOS PLASMÁTICOS.

Los parámetros no compartimentales se calcularon de acuerdo con la teoría de los momentos estadísticos (Riegelman y Collier, 1980; Gibaldi y Perrier, 1982; Yamaoka y cols., 1978b).

La biodisponibilidad se ha calculado relacionando las áreas totales bajo las curvas de concentración sérica obtenidas por el método trapezoidal, tras las administraciones extravasculares (SC_1 y SC_2) e intravenosa. Este parámetro queda indicado como F .

$$F(\%) = \frac{AUC_{ev}}{AUC_{iv}} \cdot 100$$

El tiempo medio de absorción (MAT) se ha calculado mediante la diferencia entre los tiempos medio de residencia (MRT) de la vía extravascular y la vía intravenosa.

$$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}$$

3.7.3.- ESTIMACIÓN DE LA ABSORCIÓN *IN VIVO* MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Para evaluar la cantidad de fármaco absorbido en función de la dosis y la formulación empleada, se ha utilizado la técnica de deconvolución numérica, como indica Wagner (1993). Las pendientes y ordenadas obtenidas de las ecuaciones poliexponenciales tras la administración intravenosa de ceftiofur, y las curvas plasmáticas obtenidas tras las administraciones extravasculares, han sido utilizadas para construir la función impulso-respuesta que permite descomponer las curvas extravasculares para obtener la cantidad de fármaco absorbida en función del tiempo. A partir de estos datos puede estimarse la velocidad media de absorción, la constante de absorción y la fracción de fármaco absorbido en función de la dosis administrada (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a).

3.8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Con el fin de evaluar la homogeneidad de los datos utilizados se ha realizado un análisis estadístico mediante el programa SPSS 19.0

Para el análisis general de las variables se han empleado los métodos descriptivos básicos para las variables cuantitativas, obteniendo la media, desviación estándar, el coeficiente de variación y el error estándar.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis. Esta prueba realiza un test de hipótesis para comprobar si existe o no igualdad entre las varianzas. Para ello se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de ceftiofur no varían entre animales, y que no varían entre tiempos. Se debe de aceptar la primera hipótesis nula (igualdad entre animales) y rechazar la segunda (no igualdad entre tiempos). De esta forma, si se demuestra la no existencia de diferencias significativas entre los animales, la única fuente de variación es el

tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones.

Por otra parte, se han utilizado dos test estadísticos no paramétricos para comprobar si existen o no diferencias significativas de los parámetros farmacocinéticos obtenidos entre las diferentes vías de administración del fármaco, en los animales utilizados. El primero de ellos es la prueba de Kruskal-Wallis para contrastar si los valores para cada parámetro farmacocinético son iguales o diferentes entre todas las vías de administración (IV, SC1, SC2).

Se realizó un segundo análisis no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, con el fin de determinar entre qué vías se presentan las diferencias.

Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya p obtenida es menor de 0,05.

3.9.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, PREVENTIVA DE MUTANTES Y CURVAS DE LETALIDAD DE CEFTIOFUR FRENTE A CEPAS DE CAMPO DE *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*. ESTUDIOS *IN VITRO* Y *EX VIVO*.

Para evaluar la actividad bactericida de ceftiofur se utilizaron dos cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de una cabra con neumonía y cedidas, generosamente, por la profesora Carmen Borge Rodríguez del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

3.9.1.- CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS.

Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron mediante el método de la microdilución en placas de microtitulación (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2002 Y 2006). Tras incubar a +37°C durante una noche

en placas de triptona soya agar con un 5% de sangre de carnero, el inóculo fue suspendido en una solución salina (NaCl) al 0,9% hasta obtener una turbidez estándar de 0,5 según la escala de McFarland que equivale, aproximadamente, a un rango de entre cien y doscientos millones de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL). Posteriormente estas suspensiones se diluyeron con medio de cultivo hasta una concentración aproximada de 5×10^6 CFU/mL unos 15 minutos antes de su análisis. Las placas con volúmenes de celda de 100 μ L contenían diluciones de ceftiofur comprendidas entre 0,03 y 128 μ g/mL en caldo Mueller-Hinton y fueron inoculadas con 10 μ L de las diferentes cepas (se alcanzó una concentración final aproximada de 5×10^5 CFU/mL). Las placas se incubaron a +37°C en estufa y se observaron a las 24 horas. Se procedió a su lectura posteriormente mediante una lámpara de fluorescencia y una lupa. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación, se depositaron las placas individualmente, sin apilar y tapadas para evitar la evaporación. Se consideró positivo el crecimiento si había un botón de 2 mm de diámetro de crecimiento del microorganismo. La interpretación de los resultados se facilitó tomando siempre como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control (sin fármaco). Las cepas utilizadas como control positivo y negativo fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) respectivamente.

Se definió la concentración mínima inhibitoria (CMI o MIC) de cada cepa como aquella concentración de antibacteriano más baja que inhibía el crecimiento bacteriano.

Las cepas utilizadas se cultivaron diariamente. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron en todos los casos del mismo rango de valores.

3.9.2.- CONCENTRACIONES PREVENTIVAS DE MUTANTES.

Se define la concentración preventiva de mutantes (CPM o MPC) como la concentración de antimicrobiano que previene el crecimiento de los microorganismos menos susceptibles cuando se utilizan inóculos con elevadas

cantidades de bacterias ($\geq 10^9$), empleando el método de dilución en agar (Mouton y cols., 2005). Es una metodología similar a la obtención de la CMI en placa, pero con un inóculo mil a diez mil veces más concentrado (del orden de 10^9 CFU/mL). Es necesario, por tanto, un método de crecimiento y posterior pre-concentración de las células antes de su inoculación en placa.

Las CPM se obtuvieron mediante el método de dilución en placa descrito en la bibliografía (Blondeau y cols., 2004; Blondeau y cols., 2012). Tras incubar las bacterias en placas de agar triptona soya con un 5% de sangre de carnero durante 20-24 horas a 37°C (3 placas por cepa), se recoge el crecimiento de cada placa para cada cepa sembrada y se suspende en un bote con 100 mL de caldo de cultivo Mueller-Hinton y se lleva a incubación durante 24 horas con agitación a 200 rpm a 37°C. Teóricamente, después de esta incubación, el número de CFU/mL debe ser del orden de $1-3 \times 10^8$ y debe proporcionar un valor aproximado de 1.00 en la escala de MacFarland. Una vez medidos, y comprobados estos valores, se toman alícuotas de 10 mL en tubos estériles de plástico y se centrifugan durante 30 minutos a 5000 g. Se elimina el sobrenadante y las bacterias resultantes se resuspenden en 3 mL de caldo de cultivo fresco Mueller-Hinton. Las colonias deben ser aproximadamente del orden de 10^{10} CFU/mL, lo cual se comprueba sembrando dicho inóculo en placas mediante dilución seriada. De estos cultivos concentrados se toman alícuotas de 200 μ L de cada cepa y se inoculan en placas de agar sangre previamente preparadas con la dilución de fármaco correspondiente, entre unos niveles de 0,03 – 16 mg/mL (Blondeau y cols., 2012). Además se inocula una alícuota en una placa sin dilución de fármaco (control positivo) y se incuba también una placa sin bacteria ni fármaco (control negativo). Las placas se incuban durante 24 h en la estufa a 38°C. Se leen los resultados con una lupa y una luz fluorescente y se incuban 24h más, re-examinándose para observar posibles recrecimientos. Tras un periodo de 48 horas, se anotan los resultados para cada cepa.

La CPM se considerará aquella concentración de antibacteriano a partir de la cual no se aprecia crecimiento observable del microorganismo tras la incubación durante 24-48 h.

Este procedimiento se repite otro día y los resultados finales se calculan como media geométrica.

3.9.3.- ACTIVIDAD *EX VIVO* E *IN VITRO* DE CEFTIOFUR FRENTE A CEPAS DE CAMPO: CURVAS DE LETALIDAD.

Para estudiar el efecto de las dos formulaciones de ceftiofur empleadas (Convencional y P407-CMC), se han utilizado 2 cepas de campo de *Mannheimia haemolytica* obtenidas de cabras con neumonía, de las que se han obtenido las MIC y MPC (tabla 19). Estos datos han sido utilizados para la evaluación *in vivo* y *ex vivo* del Ceftiofur. Las CMI Y CPM de ambas cepas obtenidas previamente son:

	cepa 1	cepa 2
CMI	0,0312	0,0625
CPM	0,25	1,0

Se ha evaluado el efecto *ex vivo* que estas bacterias ejercerían sobre un animal infectado y también se determinado el efecto *in vitro* en muestras de suero previamente fortificadas con ceftiofur. La ventaja de los métodos *ex vivo* frente a los *in vitro* clásicos es que utilizan medios biológicos que tienen concentraciones de fármaco administrados directamente a los animales. No obstante, esta experiencia se ha realizado con ambos ensayos a modo de comparación.

Para el estudio *in vitro*, muestras de suero de cabra sin fármaco fueron calentadas a 56°C durante 30 minutos para evitar el efecto del sistema de complemento (Merchant y cols., 2013), posteriormente se toman alícuotas de 490 µL y se le añade a cada una un volumen de 10 µL de diferentes disoluciones de cefiofur concentradas. Se obtienen muestras de suero con concentraciones de fármaco comprendidas entre valores desde 0 x CMI (placebo sin fármaco) hasta 16 x CMI. Las muestras se filtran y esterilizan con filtros de 0,22 µm y se incuban a 37°C hasta su análisis.

A cada una de las muestras previamente preparadas se le inocula un volumen de 5 μL de una suspensión de *Mannheimia haemolytica* previamente concentrada a $1 \cdot 10^9 \text{CFU/mL}$. De esta manera cada vial de 500 μL de suero tiene la concentración de fármaco preparada y una densidad de unos $1 \cdot 10^7 \text{CFU/mL}$. Estas muestras se dejan incubar 24 h a 37°C a 200 rpm y se toman muestras a 0, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Se toman alícuotas, se diluyen y se siembran en placas de agar sangre. Se incuban 24 h y se cuentan las colonias. Se utiliza en este ensayo un grupo control de muestra de suero sin fármaco ni bacteria.

Para el estudio *ex vivo* se utilizan duplicados de las muestras cuya concentración de fármaco ya es conocida mediante HPLC. Estas muestras son calentadas, filtradas y esterilizadas como previamente se ha descrito e incubadas a 37°C . Se les añade 5 μL de la suspensión de *Mannheimia haemolytica* concentrada y se sigue el mismo procedimiento descrito para el estudio *in vitro*.

Una vez contadas las colonias y calculados los valores de UFC/mL se construyen las curvas de letalidad.

4.-RESULTADOS.

4.1.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CEFTIOFUR

Los valores de concentración plasmática de ceftiofur, obtenidos a los distintos tiempos de extracción tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de dicho antibiótico a cabras, junto con sus valores medios y estadísticos asociados, se muestran en la Tabla 5. En todos los animales, se observa un descenso rápido de las concentraciones durante la primera hora tras la administración. Posteriormente, el descenso es más moderado, como puede observarse, además, en los gráficos 1 (representaciones semilogarítmicas correspondientes a cada animal) y 2 (representación semilogarítmica de las concentraciones medias \pm SD).

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
0,083	31096,78	19951,32	32889,05	18716,55	27516,44	16765,44	24489,26	6884,10	28,11
0,166	13342,05	18228,05	29330,59	16765,12	24811,16	15659,26	19689,37	6105,78	31,01
0,25	12927,85	15997,83	25871,52	16511,02	25508,06	14787,53	18600,64	5629,20	30,26
0,5	8189,86	12911,72	17836,99	13600,96	17992,47	15224,38	14292,71	3653,76	25,56
0,75	7964,16	9470,51	13612,46	11304,79	13049,99	13712,66	11519,09	2384,02	20,69
1,00	7293,46	6128,13	11135,29	9649,36	10351,53	11348,68	9317,74	2139,07	22,96
1,50	5800,48	4763,29	8399,34	7507,39	7415,97	8035,91	6987,06	1407,29	20,14
2,00	4212,17	3451,09	4820,78	5731,45	5526,12	7417,91	5193,25	1377,39	26,529
4,00	4124,73	2979,07	2672,52	3800,21	3030,35	3182,86	3298,29	550,19	16,68
6,00	1189,64	1316,374	1503,084	1563,72	1770,10	2004,28	1557,87	297,079	19,07
8,00	977,68	652,71	1409,69	1125,49	1243,16	1173,99	1097,12	259,81	23,68
10,00	623,17	579,42	792,50	967,00	942,25	922,42	804,46	169,10	21,02
12,00	292,59	450,75	486,44	699,20	793,65	698,28	570,15	190,44	33,40
24,00		160,68		160,12	184,02	173,78	169,65	11,47	6,76

TABLA 5.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados.

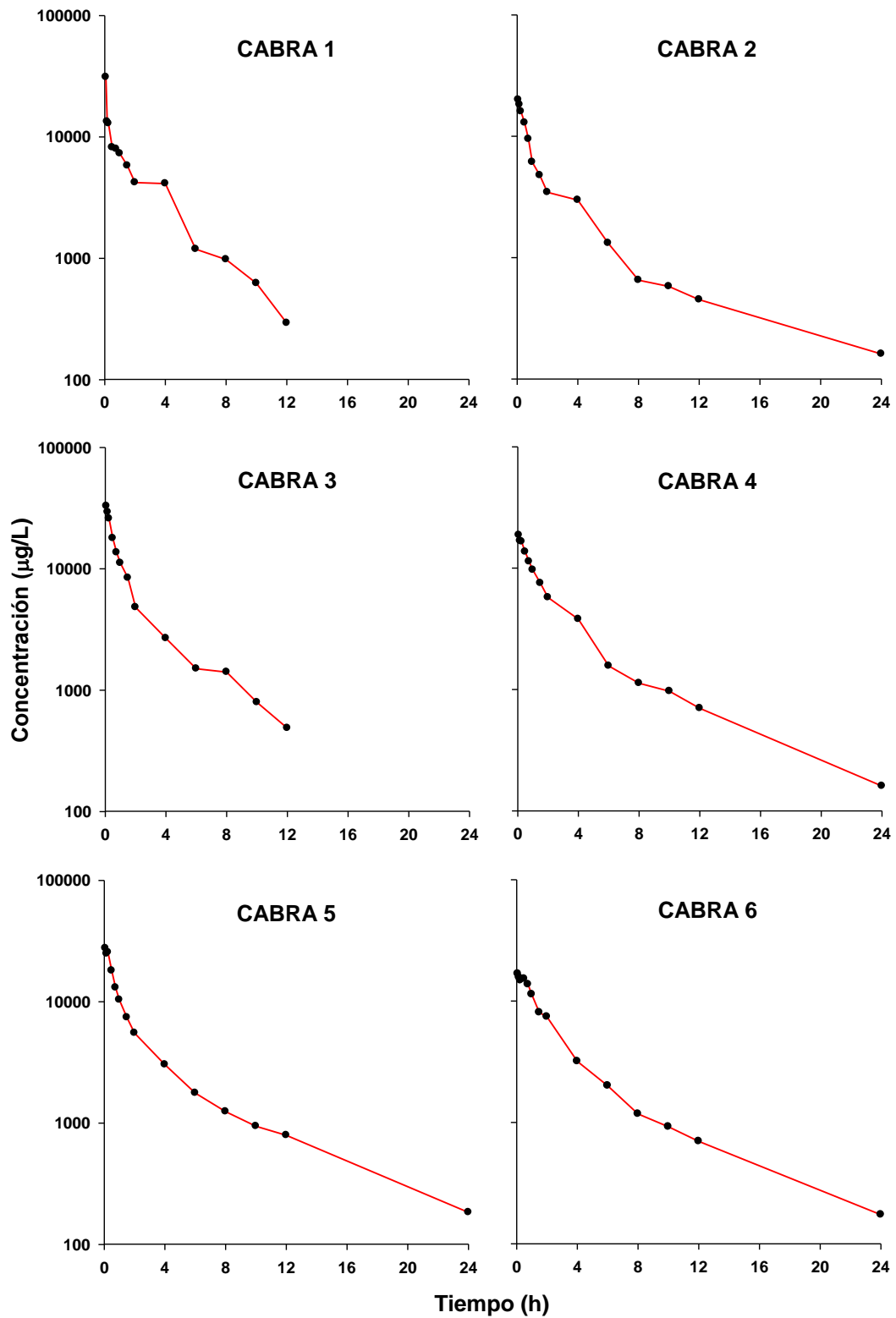


Gráfico 1.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F).

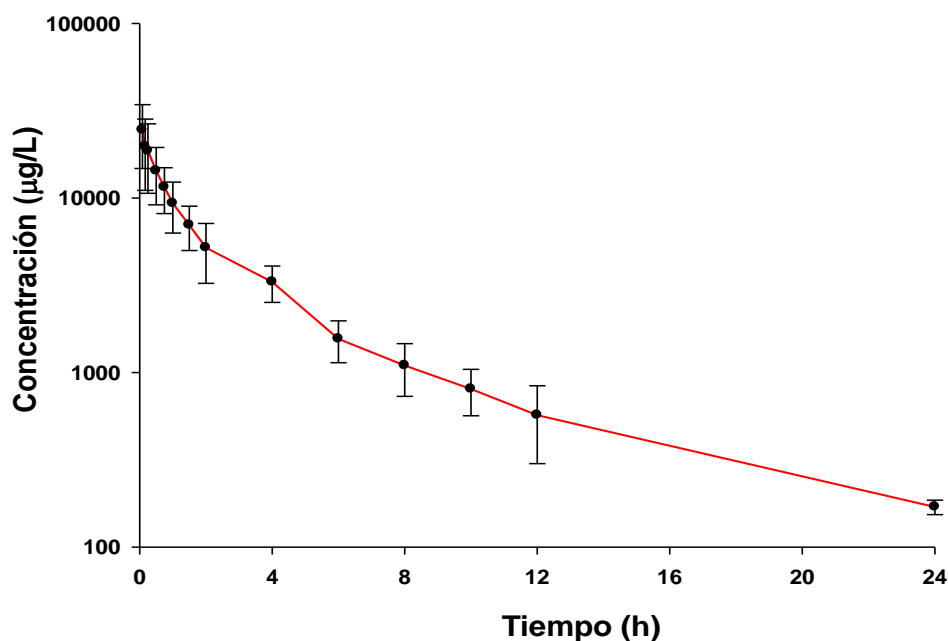


Gráfico 2.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg.

Para comprobar la homogeneidad de los datos experimentales (Tabla 6), se ha realizado un análisis de la varianza mediante el test de Kruskal-Wallis, en el que se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de ceftiofur no varían entre animales, y que no varían entre tiempos. Se debe de aceptar la primera hipótesis nula (igualdad entre animales) y rechazar la segunda (no igualdad entre tiempos).

Pruebas de bondad de ajuste (homogeneidad de Varianzas) para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$3,13 \times 10^{-11}$
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,9

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza.

TABLA 6.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración intravenosa de ceftiofur a dosis de 2mg/kg.

Una vez estudiada la homogeneidad de los datos experimentales, se llevó a cabo su ajuste a modelos compartimentales utilizando el programa de análisis farmacocinético WINNONLIN Professional® (versión 5.0). Se ha ponderado respecto al inverso de las concentraciones al cuadrado mediante regresión no lineal y se ha

utilizado el Criterio de Información de Akaike AIC (Yamaoka y cols., 1978a) como criterio de elección del modelo, resultando el mejor ajuste al modelo bicompartimental abierto (biexponencial) que es el que en todos los casos proporciona un menor valor de AIC. Los parámetros derivados de dicho modelo se muestran en la Tabla 7, mientras que la Tabla 8 muestra los resultados del análisis farmacocinético no compartimental.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-IV)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	66661,95	19204,74	29700,06	15035,38	26041,29	15207,92	28641,89	19534,97	68,20
C_z ($\mu\text{g/L}$)	9483,79	3001,26	5913,04	3172,27	3840,62	2605,14	4669,35	2634,28	56,42
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}$ (h)	0,0503	0,4805	0,4486	1,0538	0,5862	1,2667	0,217* 0,6477	0,4419	68,2277
$t_{\frac{1}{2}\lambda_2}$ (h)	2,4294	5,2124	3,4253	5,5328	5,3641	6,1520	4,2101* 4,6860	1,4342	30,6063
$t_{\frac{1}{2}k_{10}}$ (h)	0,3466	1,1200	0,9429	1,8342	1,2003	1,9811	0,8926* 1,2375	0,6008	48,5482
λ_1 (1/h)	13,7850	1,4427	1,5451	0,6578	1,1825	0,5472	3,1934	5,2046	162,9819
λ_z (1/h)	0,2853	0,1330	0,2024	0,1253	0,1292	0,1127	0,1646	0,0671	40,7393
k_{10} (1/h)	1,9999	0,6189	0,7352	0,3779	0,5775	0,3499	0,7765	0,6170	79,4619
k_{12} (1/h)	10,1038	0,6468	0,5870	0,1871	0,4696	0,1338	2,0213	3,9650	196,1592
k_{21} (1/h)	1,9667	0,3100	0,4253	0,2181	0,2646	0,1762	0,5601	0,6944	123,9672

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 7.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración intravenosa de ceftiofur, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste, junto con los parámetros estadísticos asociados.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-IV)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
AUC_{0-∞} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	38979,65	38263,08	48805,44	49383,69	54288,38	52628,11	47058,06	6846,57	14,5492
MRT (h)	2,9813	5,2869	3,0824	4,8083	4,7118	4,7691	4,2733	0,9838	23,0218
Cl (L/kg/h)	0,0513	0,0523	0,0410	0,0405	0,0368	0,0380	0,0433	0,0068	15,6053
Vss (L/kg)	0,1530	0,2763	0,1263	0,1947	0,1736	0,1812	0,1842	0,0511	27,7269
Vz (L/kg)	0,1830	0,5666	0,1909	0,3221	0,3034	0,3139	0,3133	0,1388	44,2932

Tabla 8.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración intravenosa de ceftiofur a dosis de 2 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados.

4.2.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE LA FORMULACIÓN CONVENCIONAL (SC1) DE CEFTIOFUR.

Los valores de concentración plasmática de ceftiofur, obtenidos tras la administración de una formulación acuosa convencional (SC1), a dosis de 2 mg/kg a cabras, se muestran en la Tabla 9. En ella, se observa un aumento de los niveles plasmáticos entre las 0'5 a 2 horas pos-administración, transcurrido este tiempo descienden de forma gradual hasta las 24 horas. En el Gráfico 3 se muestra la representación semilogarítmica obtenida en cada animal tras su administración subcutánea en solución acuosa, y en el gráfico 4 los valores medios de las concentraciones plasmáticas (media \pm SD), a los distintos tiempos de extracción.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras-SC1)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
0,083	214,64	1272,36	600,24	434,33	352,65	395,88	545,02	377,55	69,27
0,16	333,82	2469,99	1343,00	1163,12	970,25	592,72	1145,47	746,78	65,19
0,25	569,01	3966,82	2057,53	2639,86	1782,88	1144,19	2026,71	1191,98	58,81
0,5	957,21	7582,45	3698,26	5035,06	3970,54	1316,13	3759,94	2454,11	65,27
0,75	1193,33	7467,30	5202,10	6266,68	4278,28	4346,80	4792,42	2140,68	44,67
1	1405,19	7398,22	6092,64	6471,55	5566,47	5994,21	5488,05	2093,50	38,15
1,5	3005,46	7329,13	5321,05	6169,29	5544,98	5943,81	5552,29	1430,45	25,76
2	5177,63	4864,97	5311,63	5663,96	5361,71	6619,82	5499,95	607,075	11,04
4	4216,24	3598,34	3409,76	4397,14	4573,32	5402,63	4266,24	719,02	16,85
6	2078,34	1779,01	2076,01	2765,73	2158,48	2888,39	2290,99	436,66	19,06
8	1355,17	1042,06	1358,31	1910,06	1334,75	1947,35	1491,28	359,41	24,10
10	946,37	719,65	1025,04	1467,85	978,66	1288,17	1070,96	266,19	24,85
12	662,33	549,79	763,33	988,01	680,19	986,71	771,73	180,37	23,37
24		152,02	168,89	150,52	184,13	207,53	172,62	23,86	13,82

TABLA 9.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados.

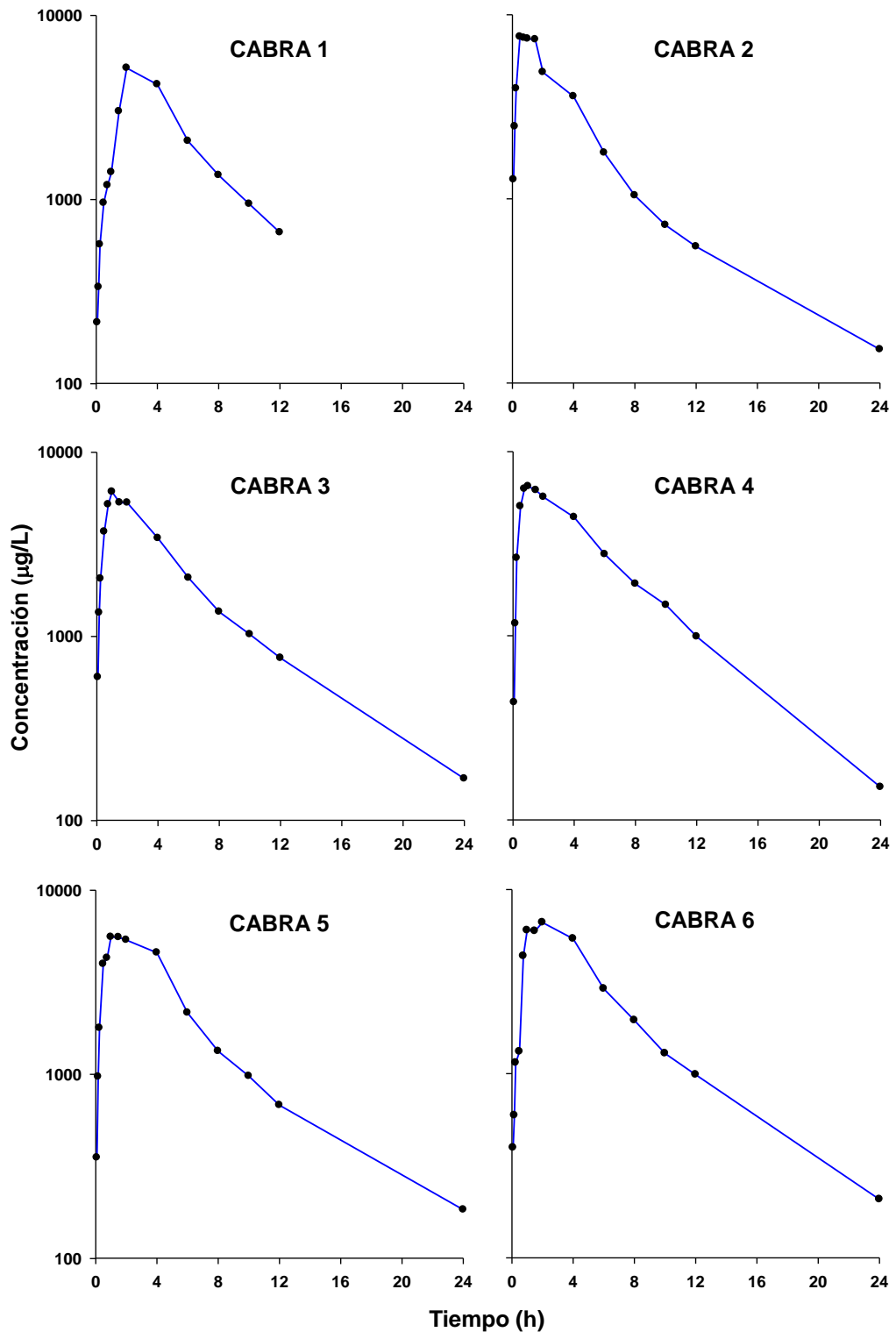


Gráfico 3.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg, a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F).

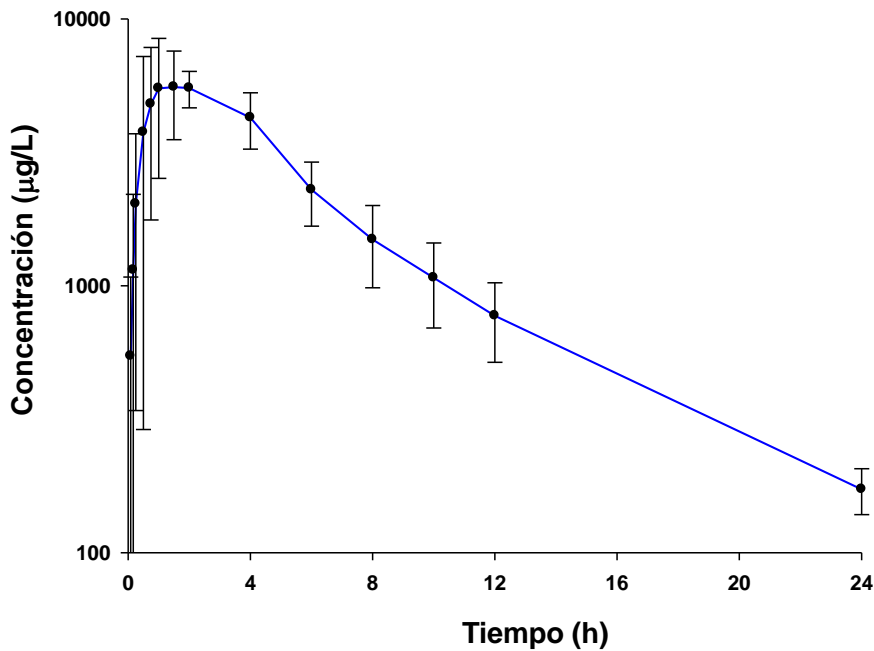


Gráfico 4.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración subcutánea de la formulación convencional, a dosis de 2 mg/kg.

Al igual que para la vía intravenosa, se ha realizado un análisis de Kruskal-Wallis para comprobar la homogeneidad de los datos (Tabla 10).

Pruebas de homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$6,40 \times 10^{-09}$
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,48

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza.

TABLA 10.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración subcutánea SC1 de ceftiofur a dosis de 2mg/kg.

Las concentraciones experimentales de cada animal se han ajustado a modelos compartimentales con ponderaciones respecto al inverso del cuadrado de las concentraciones, obteniéndose mejores ajustes al modelo bicompartimental abierto con absorción (ecuación triexponencial) que es el modelo que proporciona valores más bajos del parámetro AIC. La tabla 7 muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras este análisis, en tanto que la tabla 8 recoge los correspondientes al análisis no compartimental.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-SC1)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	3749,27	7619,02	5557,30	6173,62	5453,00	5593,87	5691,01	1249,36	21,95
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,93	1,14	1,62	1,65	1,89	2,44	1,94	0,64	32,97
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	12576,07	1501,98	3221,43	6342,58	1466,05	2149,83	4542,99	4334,93	95,42
C_2 ($\mu\text{g/L}$)	30307,14	16603,77	45422,25	12753,84	28586,12	32684,50	27726,27	11772,98	42,46
C_a ($\mu\text{g/L}$)	17731,07	15101,79	42200,82	6411,26	27120,07	30534,67	23183,28	12708,62	54,82
λ_1 (1/h)	1,0261	0,4635	0,6340	0,4443	0,4442	0,3578	0,5617	0,2448	43,59
λ_2 (1/h)	0,2538	0,0953	0,1231	0,1559	0,0860	0,1008	0,1358	0,0630	46,36
k_a (1/h)	0,7775	1,6160	0,8119	1,1834	0,7074	0,5359	0,9387	0,3941	41,98
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}$ (h)*	0,6755	1,4953	1,0933	1,5599	1,5605	1,9371	1,3869	0,4397	31,70
$t_{\frac{1}{2}\lambda_2}$ (h)*	2,7311	7,2713	5,6308	4,4444	8,0563	6,8751	5,8349	1,9844	34,01
$t_{\frac{1}{2}K_a}$ (h)*	0,8916	0,4289	0,8538	0,5857	0,9798	1,2934	0,8389	0,3038	36,22

*: Media armónica para los valores de las semividas.

Tabla 11.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1), a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-formulación SC1)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	30625,17	37631,96	37716,64	45835,49	39554,34	47941,24	39884,14	6260,08	15,69
MRT_{sc} (h)	6,0696	5,7434	6,5077	6,2114	6,5484	6,6904	6,2952	0,3544	5,62
MAT_{sc} (h)	3,0883	0,4565	3,4253	1,4031	1,8366	1,9213	2,0219	1,0940	54,11
F_{sc} (%)	78,5671	98,3506	77,2796	92,8150	72,8597	91,0944	85,1611	10,2438	12,03

Tabla 12- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1; 2 mg/kg) junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

4.3.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE CEFTIOFUR EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% (SC2).

Los valores de concentración plasmática de ceftiofur, obtenidos tras la administración subcutánea de la formulación con polímero P407+carboximetilcelulosa al 2% (SC2), a dosis de 6 mg/kg, a cabras, se muestran en las Tabla 13. En todos los animales, se observa un aumento de los niveles plasmáticos hasta aproximadamente las 2-6 horas pos-administración, y trascurrido este tiempo descienden de manera gradual hasta las 72h.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras-SC2)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
0,083	301,09	193,52	213,60	185,46	239,54	286,50	236,62	48,29	20,41
0,16	484,04	374,73	333,33	289,98	273,49	271,56	337,85	81,95	24,26
0,25	969,43	699,27	481,33	478,96	597,77	727,67	659,07	184,63	28,01
0,5	2303,21	1233,80	950,26	1045,00	2331,55	1438,98	1550,47	617,28	39,81
0,75	3409,82	2169,19	1509,91	2352,72	4510,85	1515,27	2577,96	1176,09	45,62
1	4196,23	2758,85	1686,24	2649,80	5506,28	2909,14	3284,42	1352,19	41,17
1,5	6480,15	4705,37	2715,18	4042,36	9103,73	4403,29	5241,68	2247,72	42,88
2	7773,92	5066,21	3262,37	4454,09	9781,30	6214,72	6092,103	2374,73	38,98
4	5973,26	5616,23	5030,25	6269,55	7621,05	8154,05	6444,06	1203,79	18,68
6	4462,74	6098,26	7194,21	7260,20	5447,92	8521,35	6497,45	1453,57	22,3714
8	3974,07	4937,50	6089,87	5541,64	4427,03	8022,97	5498,85	1449,91	26,37
10	3914,97	4072,10	4048,02	4499,37	3685,66	6334,53	4425,78	972,14	21,97
12	3224,54	2997,32	3645,68	3083,47	2956,67	4622,22	3421,65	638,91	18,67
24	604,17	715,43	865,14	810,33	1623,50	853,11	911,95	362,11	39,71
32	376,82	432,78	554,62	463,77	949,93	431,63	534,93	211,57	39,5582
48	275,54	285,88	355,45	343,17	305,06	433,75	333,14	58,41	17,53
72	225,48	202,62	254,55	206,42	238,99	187,26	219,22	25,06	11,43

TABLA 13.- Concentraciones plasmáticas experimentales de ceftiofur en función del tiempo (h), expresadas en µg/L, en cada cabra tras la administración subcutánea de la formulación P407/CMC (SC2) de una dosis de 6 mg/kg.

En el Gráfico 5 se muestra la representación semilogarítmica obtenida en cada animal tras su administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, y en el Gráfico 6 los valores medios de las concentraciones plasmáticas (media \pm SD), a los distintos tiempos de extracción.

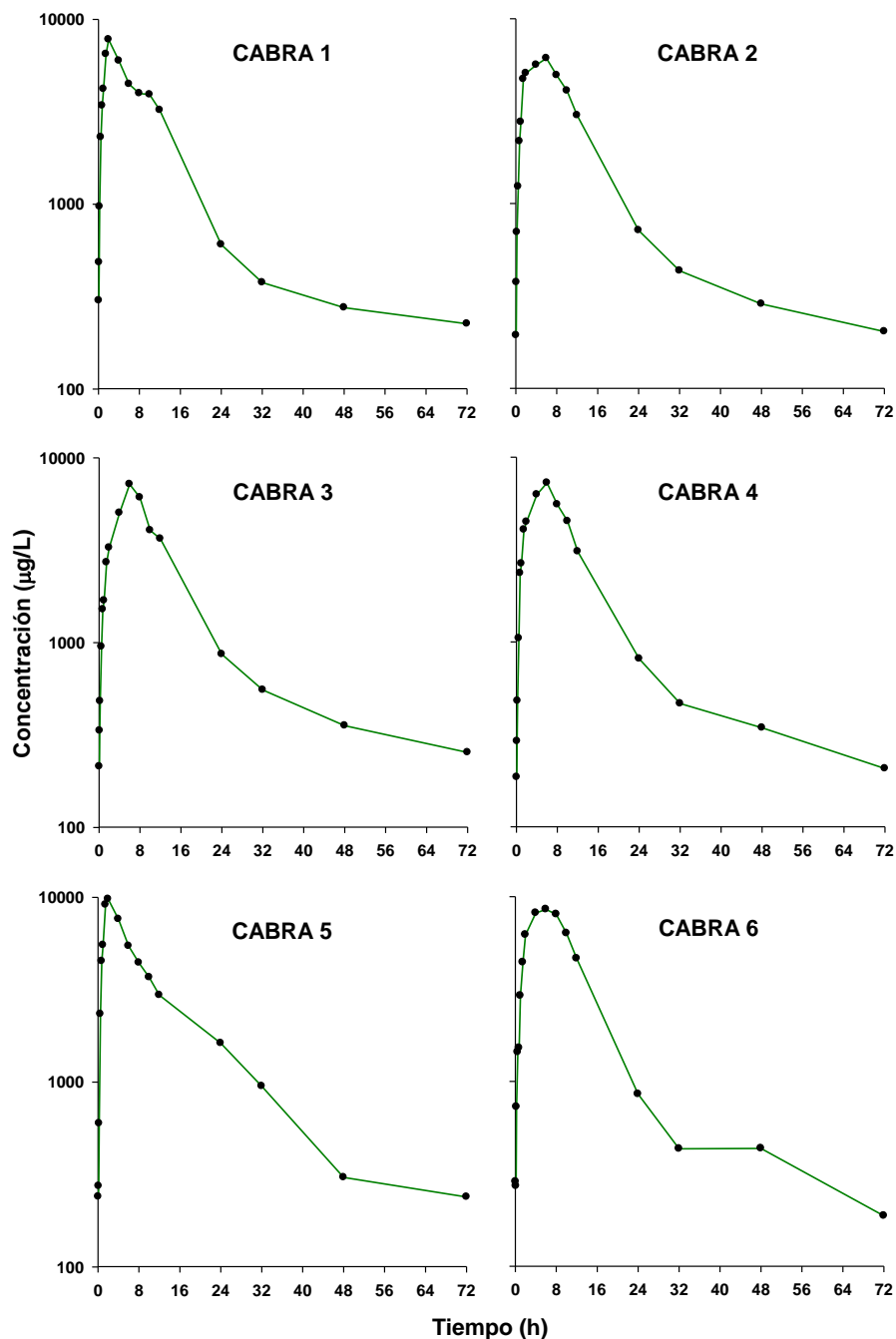


Gráfico 5.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de ceftiofur obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra (1-A, 2-B, 3-C, 4-D, 5-E y 6-F).

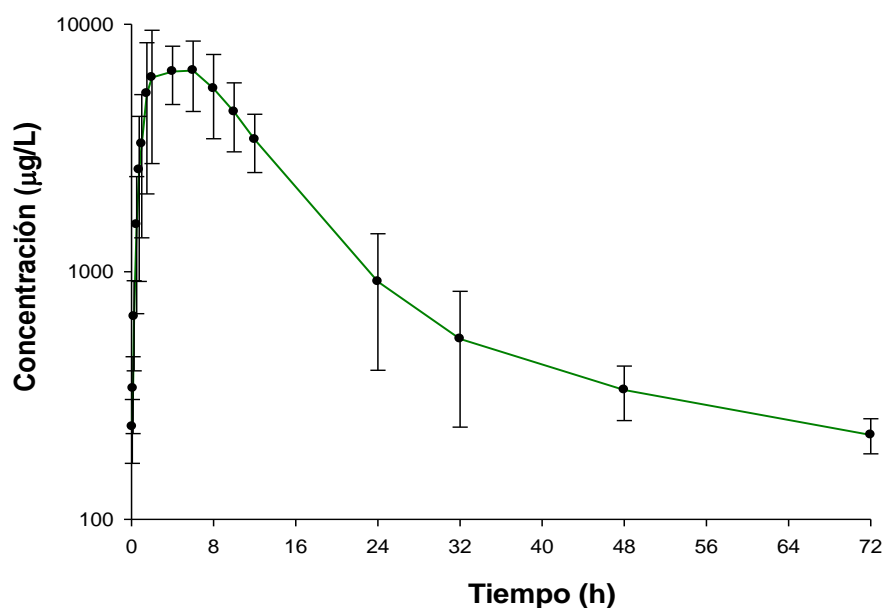


Gráfico 6.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas en cabra tras la administración subcutánea de la formulación SC2 a una dosis de 6 mg/kg.

Al igual que para la vía intravenosa e intramuscular, se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comprobar la homogeneidad de los datos (tabla 14).

Pruebas de homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	0,00
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,94

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza.

TABLA 14.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas tras la administración subcutánea de ceftiofur en formulación P407/CMC (SC2) a dosis de 6mg/kg.

Igual que se hizo en las administraciones anteriores, se han ajustado las concentraciones plasmáticas obtenidas a diversos modelos compartimentales con ponderación respecto del inverso de las concentraciones al cuadrado y se ha escogido el que presenta un menor valor de AIC. En todos los casos ha correspondido al modelo bicompartimental abierto con absorción (ecuación triexponencial).

Los parámetros farmacocinéticos del modelo bicompartimental junto con los parámetros estadísticos se muestran en la Tabla 15, mientras que en la Tabla 16 están representados los resultados de los parámetros del análisis no compartimental.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-formulación SC2)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}(\mu\text{g/L})$	7149,30	5673,69	5102,04	5617,13	7303,88	7208,03	6342,35	983,52	15,51
$T_{m\acute{a}x}(\text{h})$	3,92	4,89	5,76	5,34	3,09	5,28	4,71	1,01	21,43
$C_1(\mu\text{g/L})$	478,56	459,97	571,38	397,77	3448,50	574,09	988,38	1207,12	122,13
$C_z(\mu\text{g/L})$	33410,68	76451,89	64124,99	93045,17	35590,63	72082,81	62451,03	23632,27	37,84
$C_a(\mu\text{g/L})$	32932,11	75991,91	63553,61	92647,40	32142,13	71508,72	61462,65	24341,60	39,60
$\lambda_1(1/\text{h})$	0,1933	0,1901	0,1619	0,1770	0,2992	0,1699	0,1986	0,0507	25,5276
$\lambda_z(1/\text{h})$	0,0128	0,0124	0,0143	0,0079	0,0401	0,0137	0,0169	0,0116	68,8910
$k_a(1/\text{h})$	0,3421	0,2306	0,1986	0,2072	0,4636	0,2207	0,2771	0,1053	37,9868
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}(\text{h})^*$	3,5853	3,6467	4,2800	3,9170	2,3170	4,0796	3,4908*	3,6376	0,6975
$t_{\frac{1}{2}\lambda_z}(\text{h})^*$	54,1080	56,0251	48,5916	88,0306	17,2865	50,5898	41,1281*	52,4386	22,5226
$t_{\frac{1}{2}K_a}(\text{h})^*$	2,0263	3,0062	3,4903	3,3456	1,4952	3,1414	2,5013*	2,7508	0,8025
									29,1729

TABLA 15.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC2), a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras-formulación SC2)								
	1-A	2-B	3-C	4-D	5-E	6-F	Media	S.D.	C.V.
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	110028,35	105406,20	109586,62	124972,43	116674,22	136086,99	117125,80	11540,04	9,85
MRT_{sc} (h)	31,67	24,94	27,56	22,95	24,83	18,70	25,11	4,35	17,34
MAT_{sc} (h)	28,6938	19,6540	24,4824	18,1417	20,1233	13,9367	20,8387	5,1343	24,64
F_{sc} (%)	93,8138	90,5205	78,8084	74,5383	81,3238	87,5963	84,4335	7,4064	8,77

TABLA 16.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC2) a dosis de 6 mg/kg junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

4.4.- COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE CEFTIOFUR TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y SUBCUTÁNEA EN FORMULACIÓN CONVENCIONAL (SC1) Y FORMULACIÓN CON POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% (SC2).

Los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos, compartimentales y no compartimentales de ceftiofur tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1), y subcutánea de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) aparecen en la Tabla 17.

Parámetros	IV	SC1	SC2
$\lambda_z(1/h)$	0.1646	0.1358	0.0169
$t_{1/2\lambda_z}(h)$ *	4.2101	5.1027	41.1281
$k_a(1/h)$		0.9387	0.2771
$t_{1/2k_a}(h)$ *		0.7384	2.5013
$C_{max}(\mu g/L)$		5691.01	6342.35
$T_{max}(h)$		1.94	4.71
$AUC_{0-\infty}(\mu g \times h/L)$	47058.06	39884.14	117125.80
MRT (h)	4.2733	6,29	25.11
MAT (h)		2.0219	20.8387
$V_c(L/kg)$			
$V_{ss}(L/kg)$	0.1842		
$V_z(L/kg)$	0.3133		
Cl (L/kg/h)	0.0068		
F (%)		85.1611	84.4335

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 17.- Valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos en plasma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de ceftiofur por vía intravenosa (IV) y por vía subcutánea (SC1), y de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

En el Gráfico 7 se representan los valores experimentales medios (\pm SD) de concentración, en escala semilogarítmica, obtenidos a los distintos tiempos de extracción tras la administración de ceftiofur por las vías IV, SC1 y SC2.

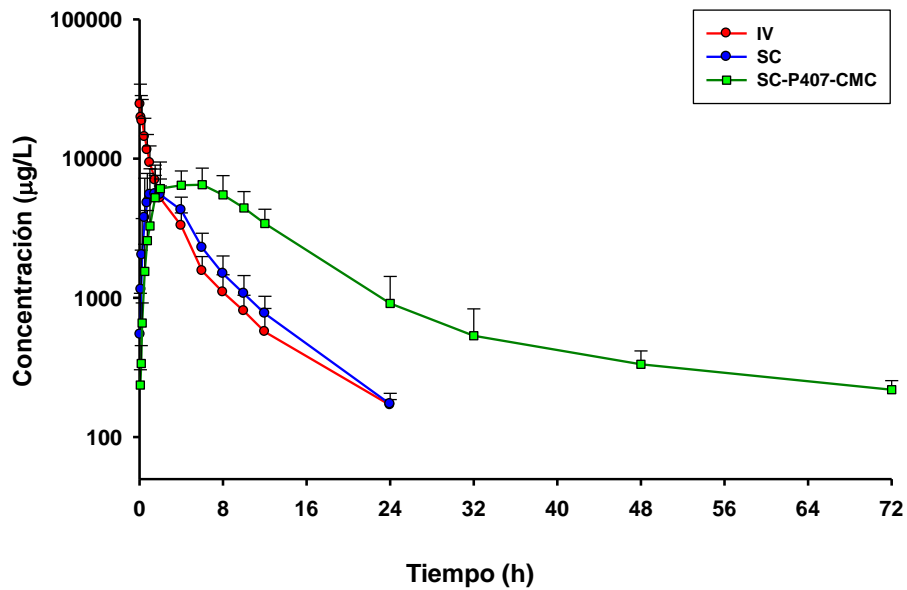


Gráfico 7.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

En el Gráfico 8 podemos ver estos mismos valores medios (\pm SD) en escala semilogarítmica únicamente de las dos vías subcutáneas (SC1 y SC2).

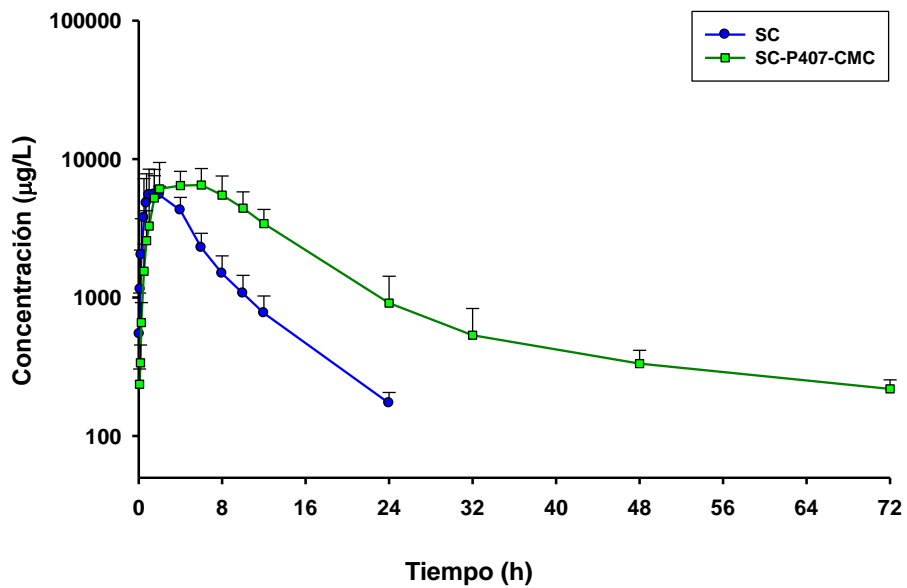


Gráfico 8.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea (SC1), y una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Para analizar la existencia de diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos procedentes de las diferentes vías de administración y formulaciones del fármaco, se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis que muestra en la tabla 18 los valores de probabilidad obtenidos para aceptar o rechazar la hipótesis nula de igualdad del parámetro. En todos los casos, excepto para el AUC, corregido según la dosis, se rechaza la hipótesis nula cuando el valor de $P < 0,05$. Para evaluar el valor de AUC, los valores de SC2 (P407/CMC) se han corregido por la dosis (6mg/kg), y se han comparado escalados a las dosis, el valor de P obtenido es < 0.06 , y esto indica que a dosis iguales no hay diferencias en las áreas.

Parámetros	P Todas las vías
$\lambda_z(1/h)$	0.0033
$t_{1/2\lambda_z}(h)$	0.0034
Beta(1/h)	0.0023
$t_{1/2\beta}(h)$	0.0023
AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\times\text{h}/\text{L}$)*	0.06
MRT (h)	0.0005

$P < 0,05$: diferencias significativas; $P > 0,05$: diferencias no significativas.

Tabla 18.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

En todos los casos, excepto para el AUC, se han obtenido diferencias significativas, dado el valor de los parámetros (Tabla 17), se puede sospechar que estas diferencias se deben a la formulación SC2. Para comprobar esta hipótesis se ha realizado un estudio estadístico no paramétrico mediante el test de Wilcoxon comparando dos a dos los parámetros de las distintas vías y formulaciones: IV/SC1, IV/SC2 y SC1/SC2.

La comparación entre los parámetros IV y SC1, se muestra en la tabla 19. Al observar los resultados de este estudio estadístico, comparando los parámetros farmacocinéticos de las administraciones IV y SC1, se comprueba que todos los parámetros son iguales menos MRT que parece ser significativamente diferente entre IV y SC1.

	λ_z	$t_{1/2\lambda_z}$	Beta	AUC	MRT
IV/SC1	1/hr	hr	1/hr	hr*ug/mL	hr
Valor P	1.0	1.0	0.2001	0.054	0.00394654

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas

Tabla 19.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a cabras.

La comparación entre los parámetros IV y SC2, se muestra en la tabla 20. Al observar los resultados de este estudio estadístico, comparando los parámetros farmacocinéticos de las administraciones IV y SC2, se comprueba que todos los parámetros muestran diferencias significativas entre la formulación convencional administrada IV y la formulación por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

	λ_z	$t_{1/2\lambda_z}$	Beta	$t_{1/2}$ -Beta	AUC/D	MRT
IV/SC2	1/hr	hr	1/hr	hr	hr*ug/mL	hr
Valor P	0.00369871	0.00394654	0.00394654	0.00394654	0.0373697	0.00394654

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas

Tabla 20.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía intravenosa (IV) y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

La comparación entre los parámetros SC1 y SC2, se muestra en la tabla 21. Al observar los resultados de este estudio estadístico, comparando los parámetros farmacocinéticos de las administraciones SC1 y SC2. Estos datos indican que sólo los valores de AUC corregida con la dosis, así como la cantidad absorbida corregida por la

dosis son iguales entre formulaciones administradas por vía subcutánea. Como resultado de ello, la biodisponibilidad y la fracción de ceftiofur absorbida no muestran diferencias significativas entre las dos formulaciones subcutáneas (SC1 y SC2). Por otro lado, la Cmax de ambas formulaciones es diferente a dosis corregidas, pero iguales sin corregir dosis. El resto de los parámetros son distintos significativamente.

	λ_z	$t_{1/2\lambda_z}$	Beta	$t_{1/2}^-$ Beta	Ka	$t_{1/2}Ka$	Tmax	Cmax	Cmax/D	
SC1/SC2	1/hr	hr	1/hr	hr	1/hr	hr	hr	ug/mL	ug/mL	
Valor P	0.0036	0.00394	0.00394	0.00394	0.00394	0.00394	0.0039	0.3366	0.0039	
	AUC	AUC/D	MRT	F%	MAT	input rate	Tmax input	amount absorbed	amount absorbed/D	Fraction input
	hr*ug/mL	hr*ug/mL	hr			mg/hr	hr	mg	mg	
SC										
SC-P407										
Valor P	0.0039	0.6309	0.0039	1.0	0.0041	0.01040	0.0471		0.262	0.109

$P < 0,05$: diferencias significativas; $P > 0,05$: diferencias no significativas.

Tabla 21.- Estudio comparativo no paramétrico (Test de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg ceftiofur por vía subcutánea (SC1) y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

4.5.- EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN *IN VIVO* DE CEFTIOFUR MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Las curvas plasmáticas experimentales obtenidas tras las administraciones extravasculares de ceftiofur en las formulaciones SC1 y SC2, han sido analizadas mediante un proceso de deconvolución numérica. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron los valores de los coeficientes y exponentes obtenidos tras el ajuste compartimental de las curvas plasmáticas de ceftiofur tras su administración intravenosa. A partir de dichos parámetros se determinó la función UIR o *unit impulse response* que permite evaluar la tasa de absorción del fármaco para cada formulación,

y estimar la cantidad del mismo que accede al compartimento central desde el depósito o zona de absorción (*WinNonlin 5,2User's Guide 262-299*).

Tras el modelado de las curvas plasmáticas extravasculares se ha obtenido para cada animal y dosis, la velocidad de absorción en función del tiempo (mg/h) y la fracción de dosis absorbida, expresada como la cantidad absorbida respecto a la cantidad administrada, que es otra forma equivalente de calcular la biodisponibilidad

$$\text{sistémica: Fracción absorbida} = \frac{\text{mg absorbidos}}{(\text{Dosis administrada} \cdot \text{Peso animal})}$$

Los resultados obtenidos para cada animal, dosis y formulación se muestran en la tabla 22 y en los gráficos 9 hasta 16, respectivamente.

Parámetros	SC1 (2mg/kg)	SC2 (6mg/kg)
Tasa de absorción máxima(mg/h)	56,64 ± 24,27	29,30 ± 5,10
Tiempo de tasa de absorción máxima(h)	0,64 ± 0,26	1,92 ± 0,32
Cantidad total absorbida (mg)	83,98 ± 12,44	224,74 ± 23,10
Fracción absorbida*	0,87 ± 0,15	0,75 ± 0,02

* Equivale a la cantidad total absorbida normalizada a 2 mg/kg.

Tabla 22.- Parámetros descriptores de la absorción extravascular obtenidos tras deconvolución numérica para las formulaciones SC1 y SC2 a 2, 6 y 6 mg/kg, respectivamente, En todos los casos se ha tomado referencia para cada animal las curvas plasmáticas obtenidas tras las administración intravenosa de ceftiofur a 2 mg/kg.

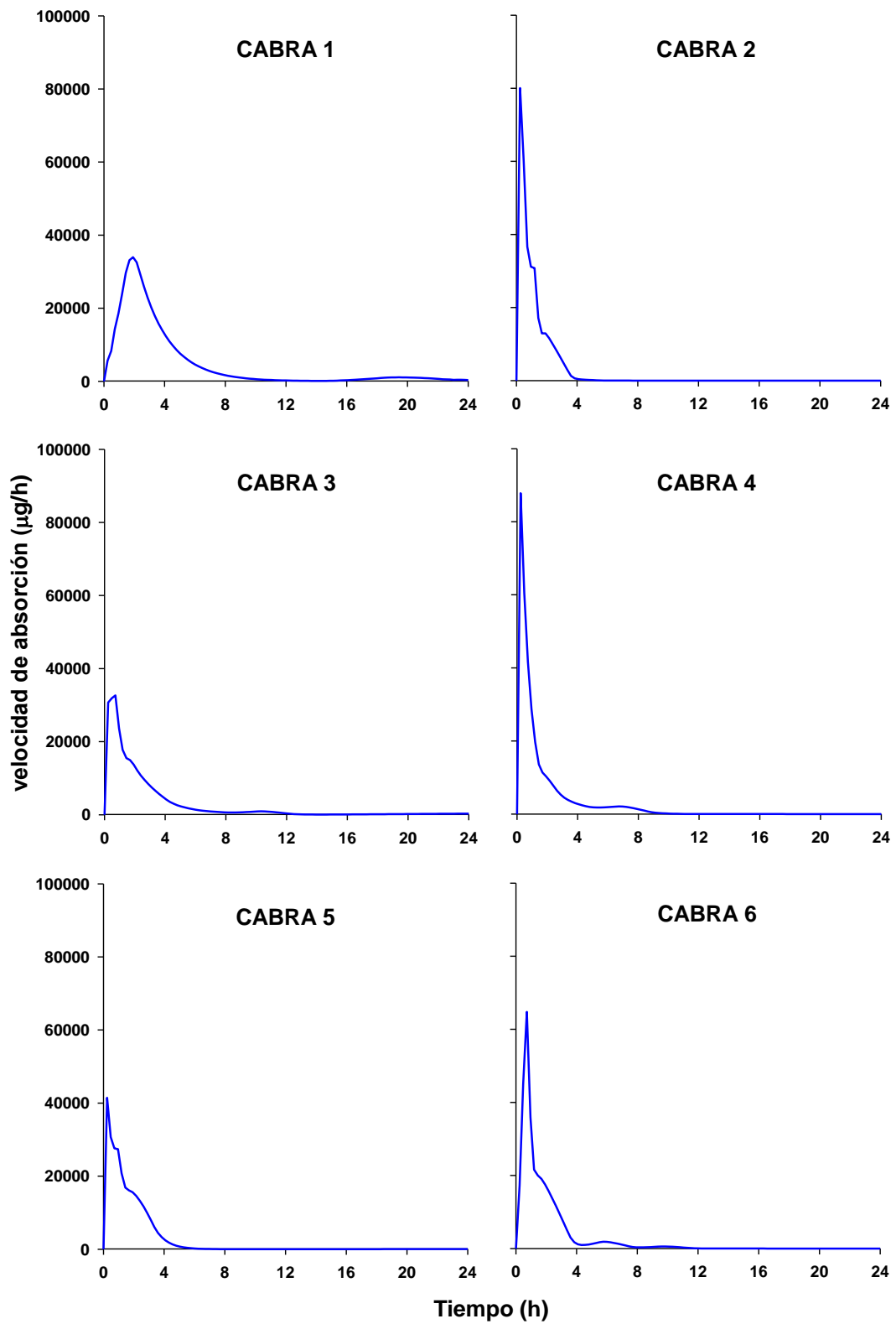


Gráfico 9.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

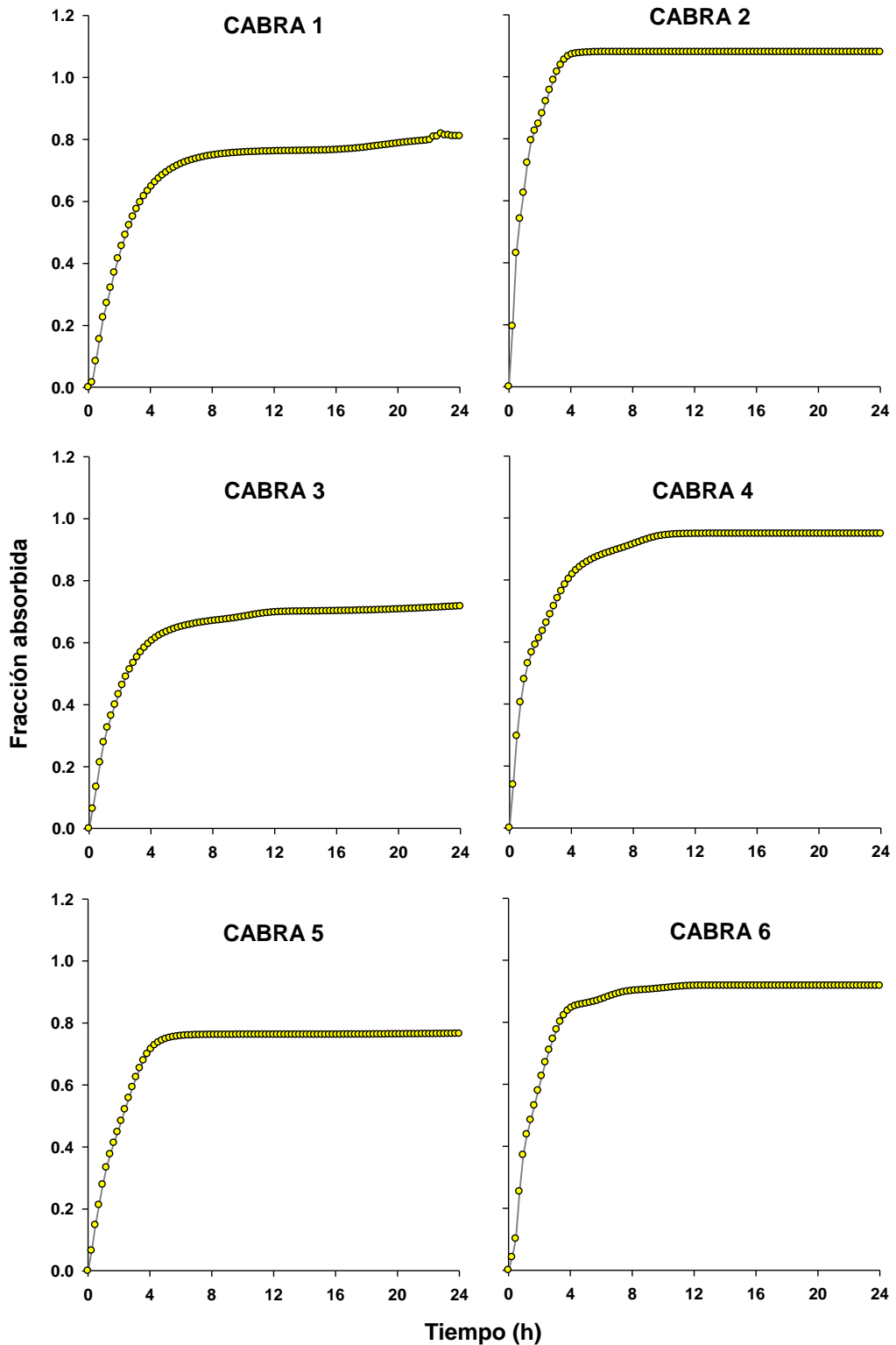


Gráfico 10.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

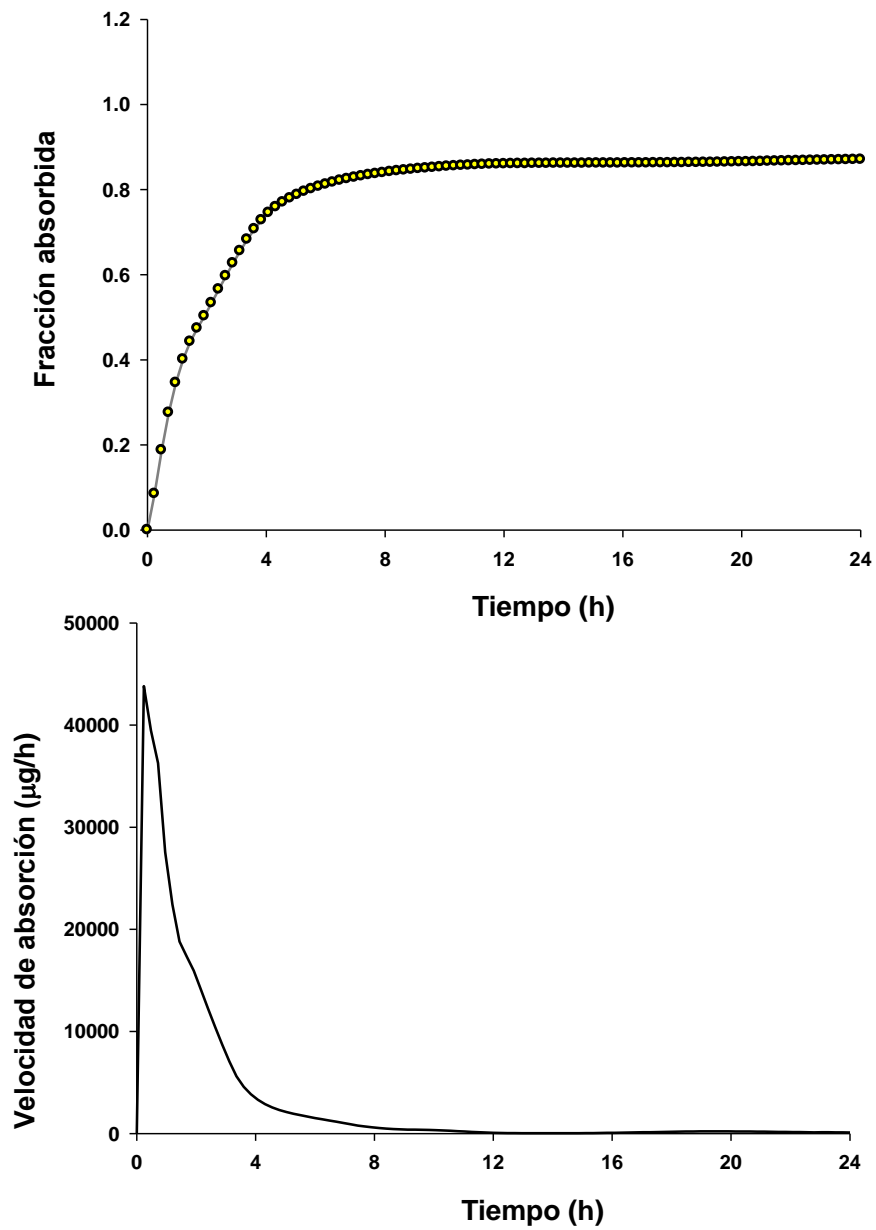


Gráfico 11.- Representación gráfica de la fracción absorbida y la velocidad de absorción promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de ceftiofur (SC1) a una dosis de 2 mg/kg.

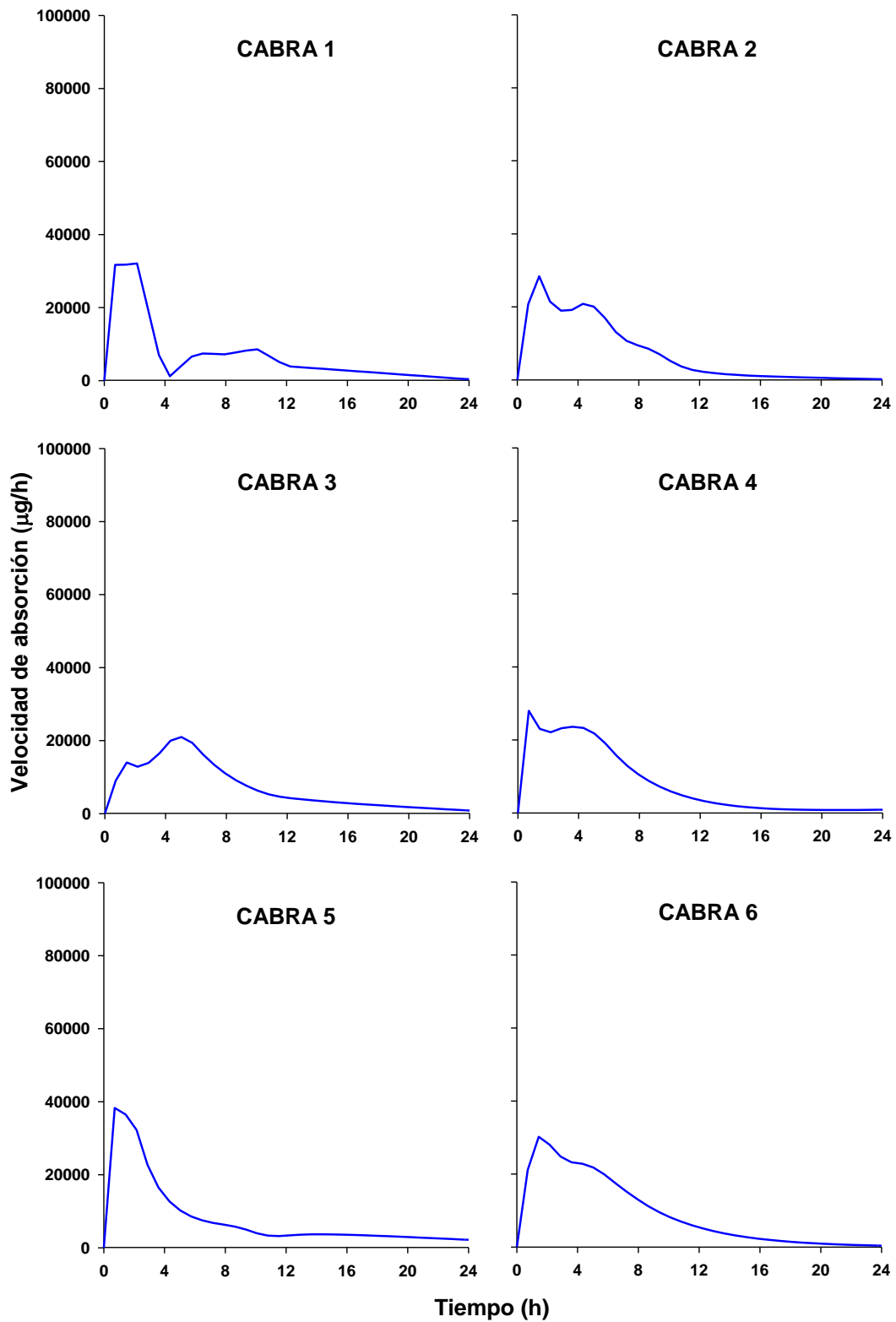


Gráfico 12.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

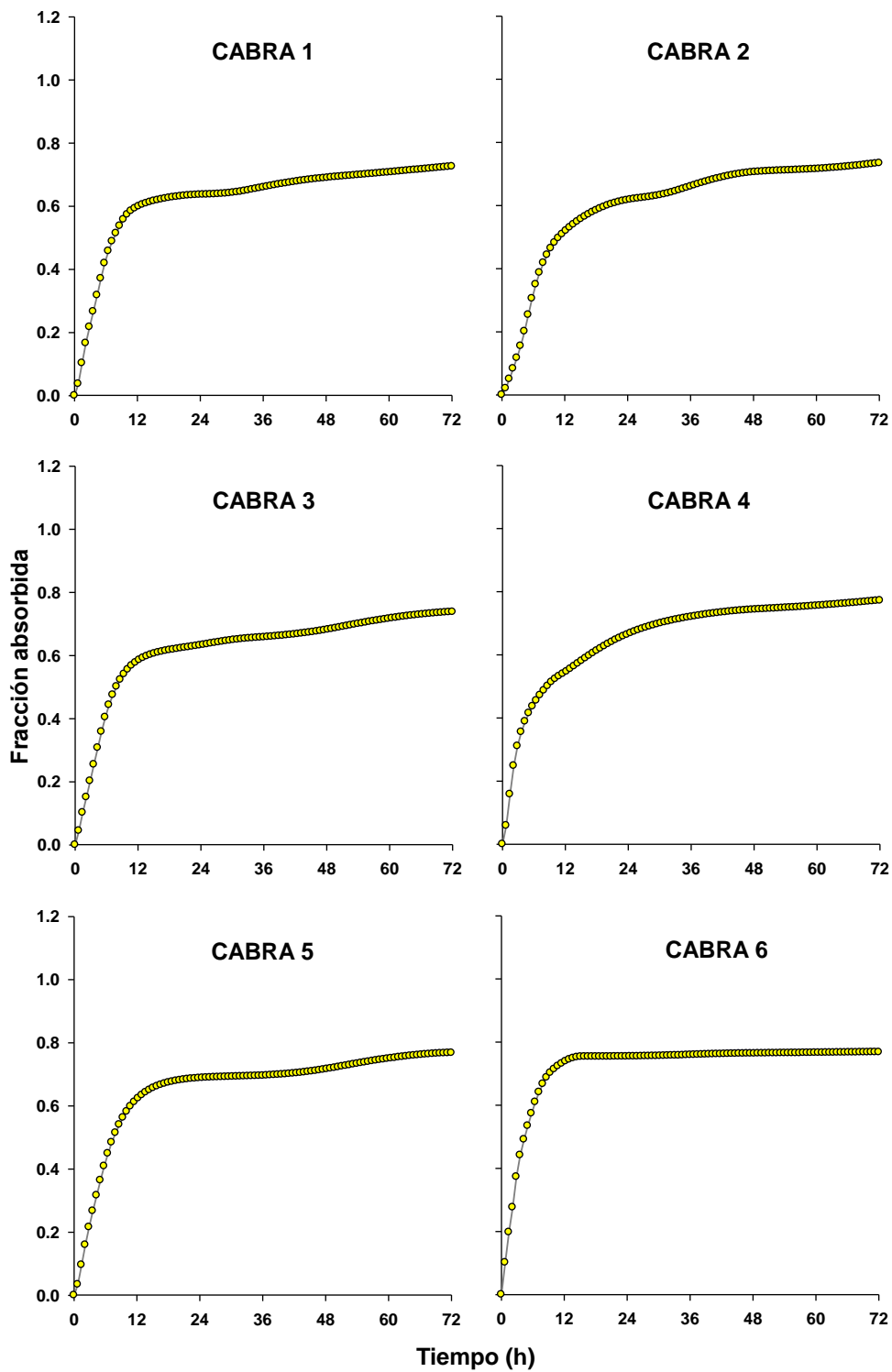


Gráfico 13.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

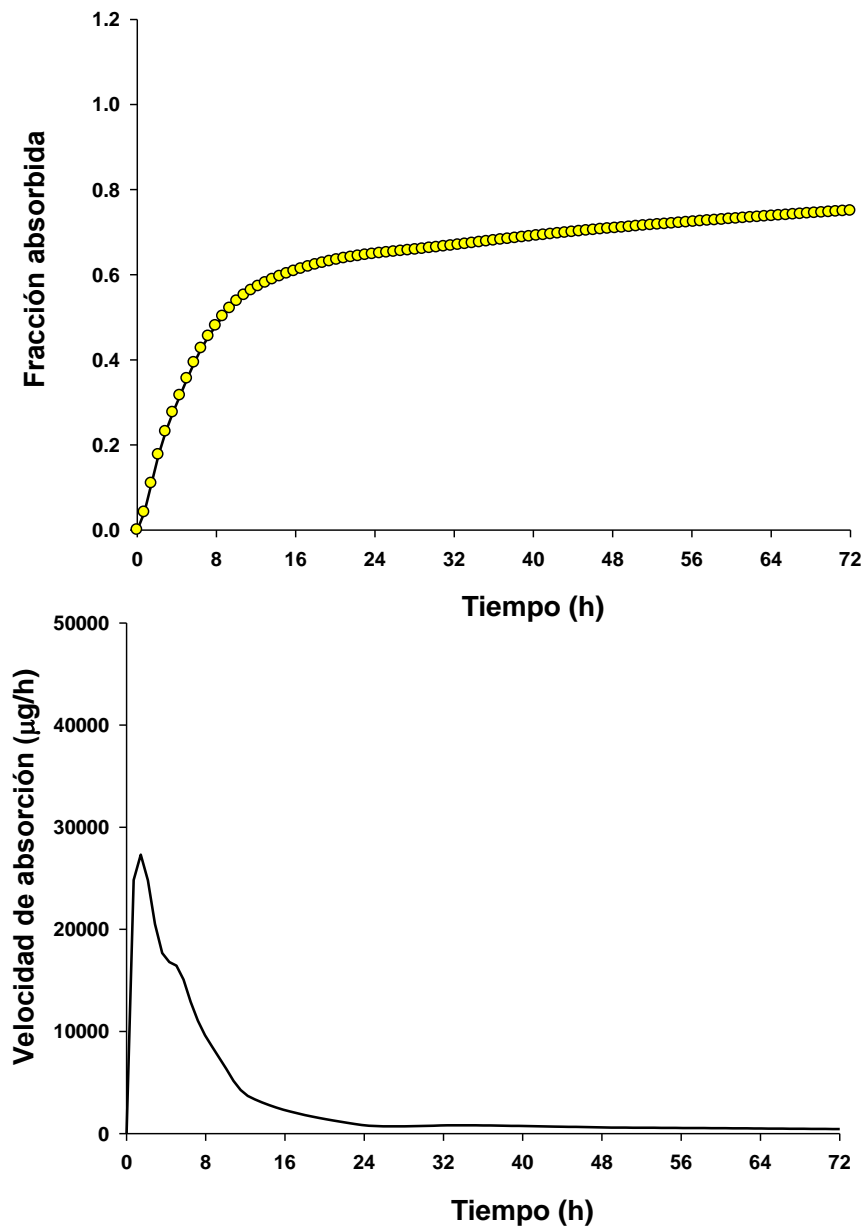


Gráfico 14.- Representación gráfica de la fracción absorbida y la velocidad de absorción promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de ceftiofur a una dosis de 6 mg/kg.

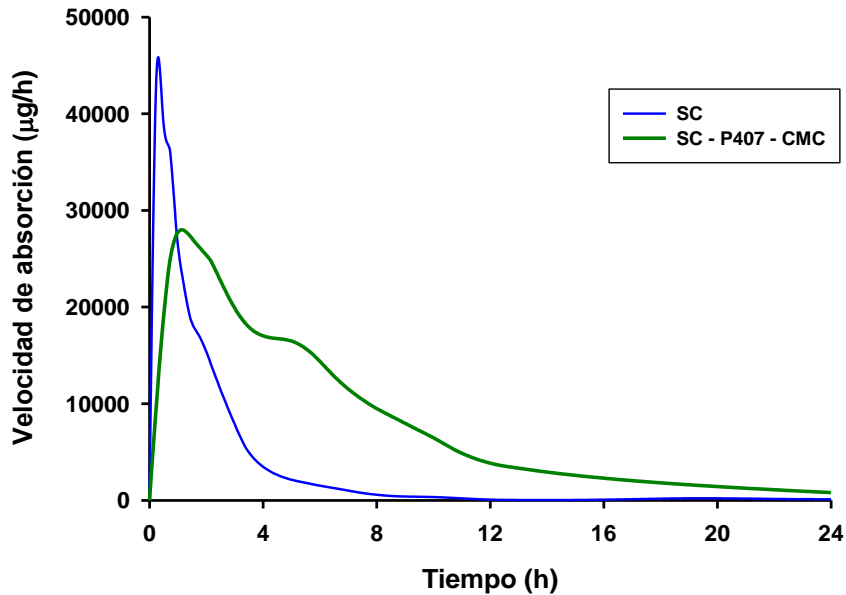


Gráfico 15.- Representación gráfica de las velocidades de absorción promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg.

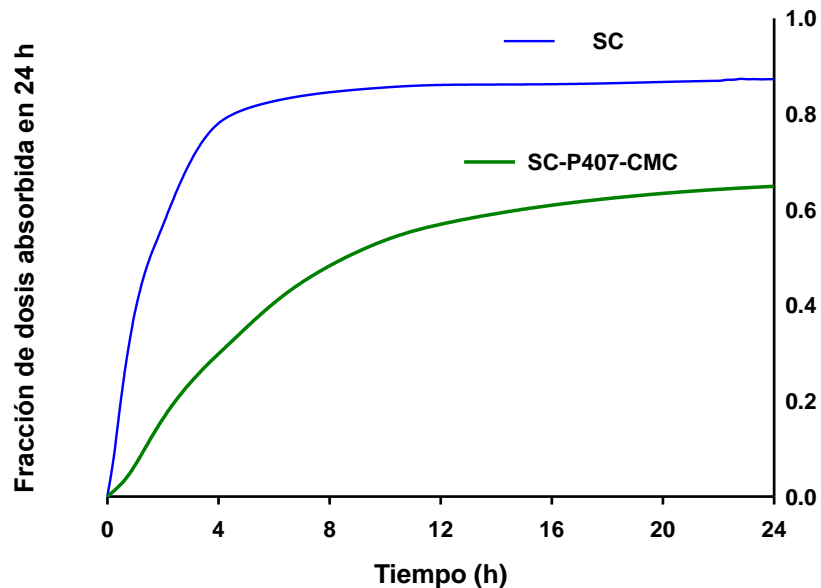


Gráfico 16.- Representación gráfica de las fracciones absorbidas promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg.

4.6.- EXCRECIÓN EN LECHE DE CEFTIOFUR TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y SUBCUTÁNEA EN FORMULACIÓN CONVENCIONAL (SC1) Y FORMULACIÓN CON POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% (SC2).

El análisis cromatográfico de las muestras de leche obtenidas, en todos los casos (distintas vías y distintas formulaciones) ha puesto de manifiesto que las concentraciones que puedan existir están por debajo del límite de cuantificación de la técnica utilizada. En la mayoría de los casos no se evidencia la presencia de ceftiofur en la leche de las cabras estudiadas.

4.7.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, PREVENTIVA DE MUTANTES Y CURVAS DE LETALIDAD DE CEFTIOFUR FRENTE A CEPAS DE CAMPO DE *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*. ESTUDIOS *IN VITRO* Y *EX VIVO*.

4.7.1. CMI y CPM E INTEGRACIÓN PK/PD.

En el estudio de la actividad bactericida del ceftiofur, se han utilizado 2 cepas de campo de *Mannheimia haemolytica* aisladas de cabras con neumonía. Las CMI y CPM de ambas cepas se muestran en la tabla 23.

	cepa 1	cepa 2
CMI (MHB)	0.031	0.0625
CMI (suero)	0.031	0.0625
CPM (placa)	0.25	1

Tabla 23. CMI y CPM de Ceftiofur frente a dos cepas de *M. haemolytica* obtenidas de cabras con neumonía.

En relación a los valores de CMI entre medios de crecimiento no hay diferencia, tal y como le ocurre a otros autores con otros cefalosporinas (cefquinoma) en dichos medios (Shan y cols., 2014).

En la tabla 24 se muestran los valores de T>CMI y T>CPM para cada una de las dos cepas de *M. haemolytica* evaluadas para cada dosis y vía de ceftiofur. En las figuras 17 y 18 se muestran dichos índices a 24 y 72 horas respectivamente.

T>CMI	Cabra 1	Cabra 2	Cabra 3	Cabra 4	Cabra 5	Cabra 6	Media	S.D.	C.V.
Cepa 1 IV	19,34	42,76	25,89	38,32	38,71	39,42	34,07	9,25	27,14
Cepa 2 IV	17,12	34,45	22,48	32,94	33,21	32,98	28,86	7,24	25,09
Cepa 1 SC1	32,45	41,44	37,26	34,77	40,14	38,08	37,36	3,34	8,94
Cepa 2 CS1	27,85	34,12	31,70	30,22	33,80	32,68	31,73	2,38	7,49
Cepa 1 SC2	>72	>72	>72	>72	>72	>72			
Cepa 2 CS2	>72	>72	>72	>72	>72	>72			
T>CPM	Cabra 1	Cabra 2	Cabra 3	Cabra 4	Cabra 5	Cabra 6	Media	S.D.	C.V.
Cepa 1 IV	12,45	18,16	14,66	19,87	21,50	20,53	17,86	3,58	20,03
Cepa 2 IV	7,18	6,66	9,15	8,89	10,00	9,66	8,59	1,36	15,83
Cepa 1 SC1	18,79	18,97	20,40	20,28	21,18	22,36	20,33	1,35	6,63
Cepa 2 CS1	9,27	8,00	10,00	12,00	10,00	12,00	10,21	1,57	15,34
Cepa 1 SC2	47,95	53,67	72,00	61,05	72,00	62,33	61,50	9,66	15,70
Cepa 2 CS2	20,18	20,17	22,81	21,79	30,94	22,81	23,12	4,01	17,35

Tabla 24. Valores de T>CMI y T>CPM (h) para *M. haemolytica* obtenidos tras la administración intravenosa y subcutánea de la formulación convencional (SC1) de ceftiofur a una dosis de 2 mg/kg y tras la formulación polimérica de poloxamer (SC2) a 6 mg/kg.

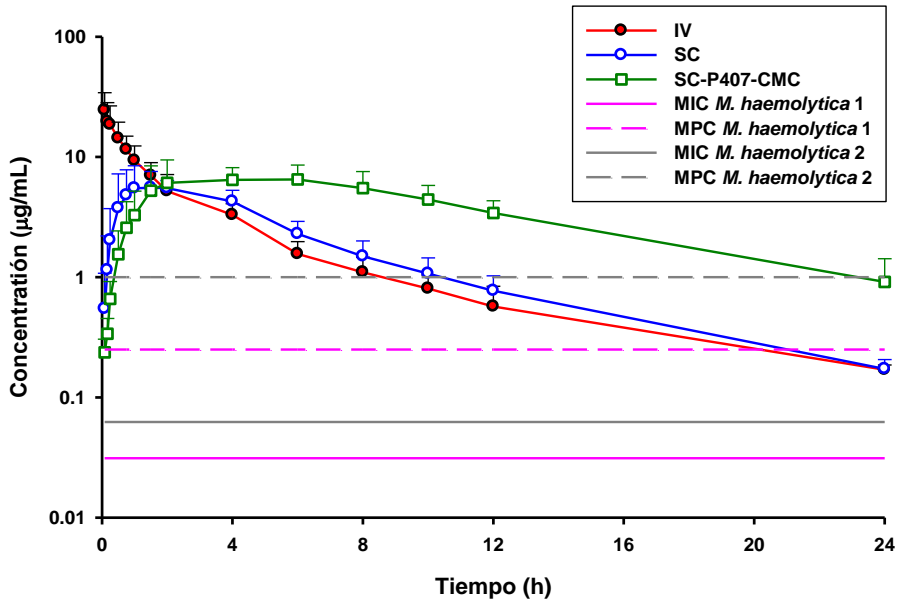


Gráfico 17.- Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 24 horas.

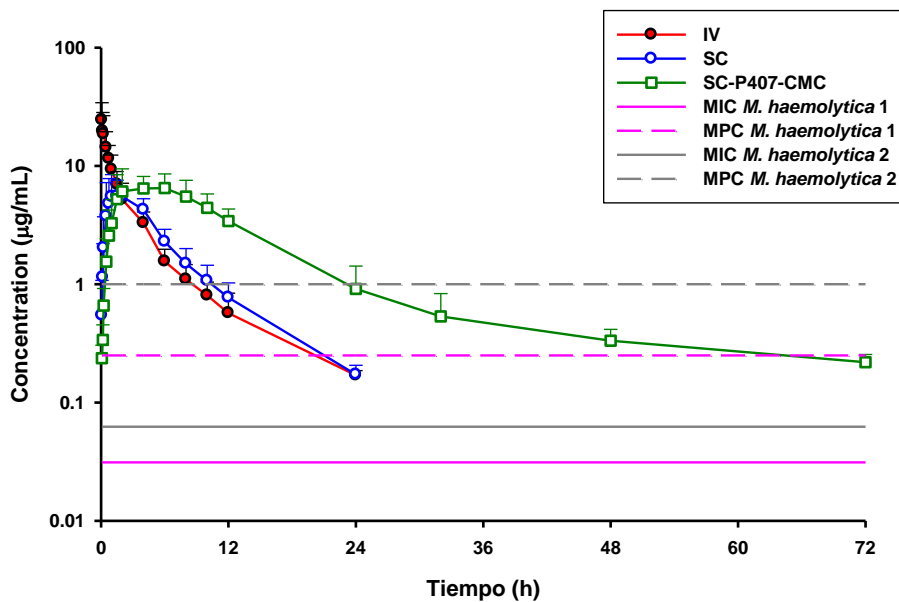


Gráfico 18.- Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 72 horas.

Tras el cálculo de los índices PK/PD y tras obtener los parámetros farmacocinéticos promedios mediante ajuste compartimental se realizan simulaciones para las administraciones SC1 a 2 mg/kg y SC2 a 6 mg/kg durante 7 días cada 24 horas en relación a los valores de CMI y CPM (figura 19). También se realiza dicha simulación comparando la formulación SC1 a 2 mg/kg con la SC2 a 2 mg/kg, y las formulación SC1 a 6 mg/kg con la formulación SC2 a 6 mg/kg (figuras 20 y 21 respectivamente). También se realiza una simulación de la formulación SC1 a 2 mg/kg cada 12 horas durante 7 días de tratamiento frente a la formulación SC1 a 6 mg/kg (figura 22).

SIMULACIÓN 1: formulación SC1 a 2 mg/kg frente a formulación SC2 a 6 mg/kg

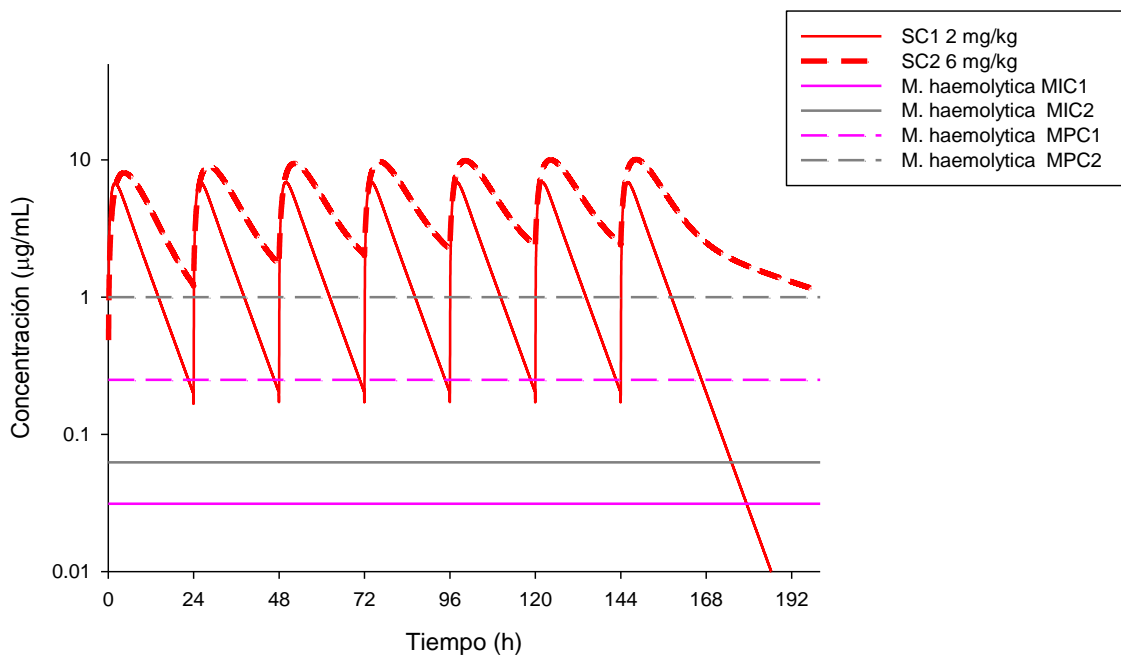


Gráfico 19.-Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg) y SC2 (6 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T> CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino.

SIMULACIÓN 2: formulación SC1 a 2 mg/kg frente a formulación SC2 a 2 mg/kg

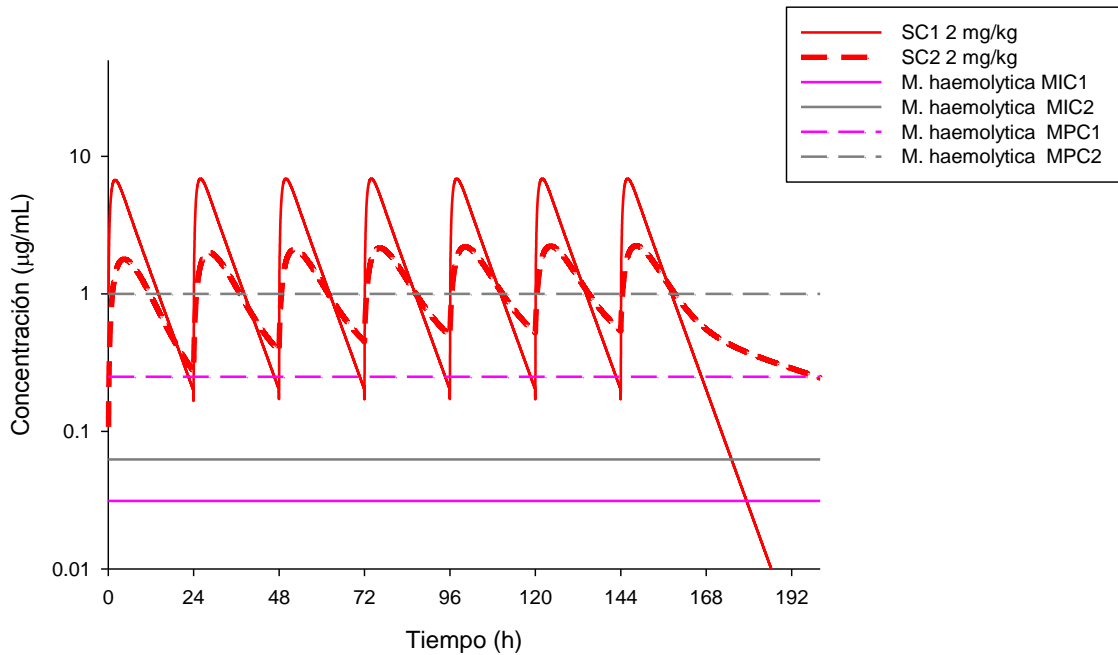


Gráfico 20.-Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg) y SC2 (2 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino.

SIMULACIÓN 3: formulación SC1 a 6 mg/kg frente a formulación SC2 a 6 mg/kg

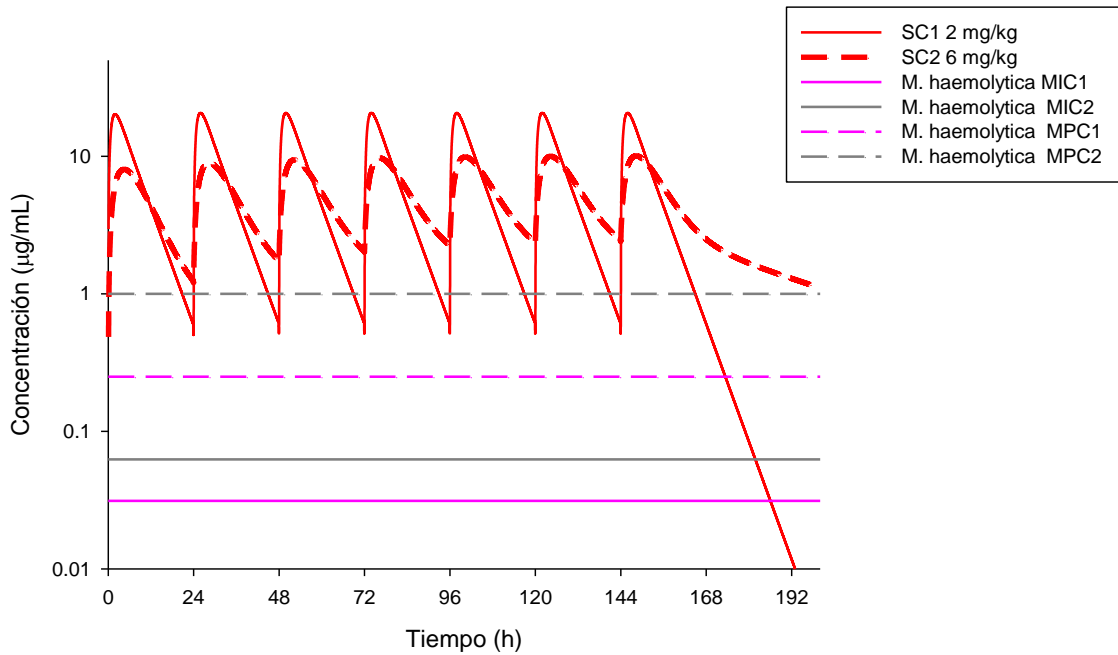


Gráfico 21.-Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (6 mg/kg) y SC2 (6 mg/kg) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino.

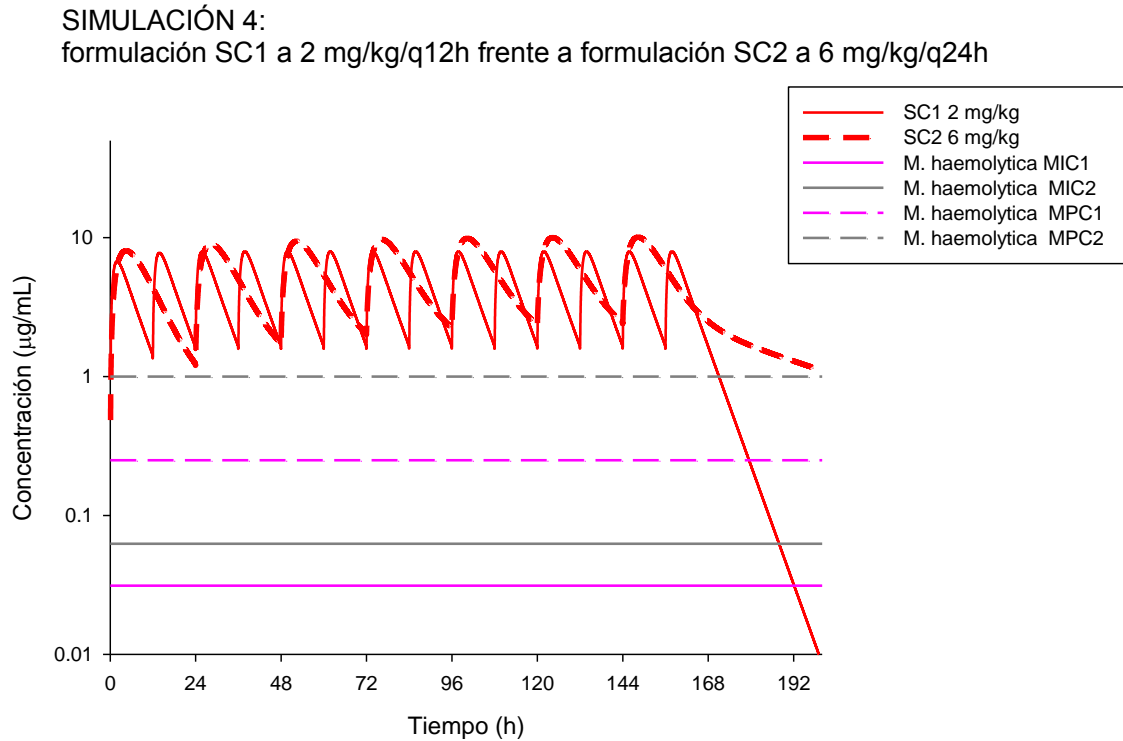


Gráfico 22.-Simulación de dos posologías múltiples subcutáneas para la formulación SC1 (2 mg/kg/q12h) y SC2 (6 mg/kg/q24h) durante 7 días cada 24 horas en relación a los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* estudiadas en caprino.

4.7.2.- ESTUDIO *IN VITRO* Y *EX VIVO*: CURVAS DE LETALIDAD.

Los valores de unidades formadoras de colonias de cada cepa, y promediadas, tras los ensayos *in vitro* en suero se muestran en las tablas 25, 26, y 27. Las figuras 23, 24 y 25 muestran las curvas de letalidad obtenidas, respectivamente.

CMI = 0,0312	0	0.25 CMI	0.5 CMI	1 CMI	2 CMI	4 CMI	8 CMI	16 CMI
Concen-tración (µg/mL)	0	0.0078	0.0156	0.0312	0.0624	0.1248	0.2496	0.4992
Tiempo (h)	CFU/mL							
0	3.23E+06	2.90E+06	3.25E+06	2.23E+06	1.02E+06	3.33E+06	1.09E+06	6.89E+06
1	4.85E+08	6.17E+08	1.20E+07	1.53E+07	3.27E+05	9.90E+05	1.88E+05	2.37E+04
2	3.20E+09	1.46E+08	5.23E+08	6.60E+06	5.06E+05	6.58E+05	8.91E+05	2.36E+04
4	6.98E+09	8.89E+08	2.66E+08	9.87E+06	2.15E+05	8.56E+04	1.03E+04	1.05E+04
8	2.17E+09	3.74E+09	7.01E+08	3.25E+06	9.55E+04	1.03E+04	6.20E+02	9.41E+02
24	8.98E+09	1.16E+09	9.76E+08	2.87E+07	8.75E+05	1.89E+03	6.20E+01	8.80E+01
Concen-tración (µg/mL)	0	0.0078	0.0156	0.0312	0.0624	0.1248	0.2496	0.4992
Tiempo (h)	CFU/mL							
0	5.00E+06	3.78E+06	5.69E+06	3.25E+06	2.85E+06	5.81E+06	3.90E+06	5.86E+06
1	1.47E+09	7.06E+07	2.15E+07	9.66E+06	5.26E+06	6.52E+04	1.13E+05	9.85E+04
2	2.29E+09	8.10E+08	1.22E+07	3.26E+06	5.49E+05	8.21E+04	3.27E+05	1.27E+04
4	1.27E+09	9.99E+09	1.15E+08	1.86E+06	1.07E+05	1.06E+04	6.60E+04	1.03E+03
8	4.08E+09	7.41E+08	6.60E+08	9.87E+05	9.85E+04	8.99E+03	5.58E+03	1.88E+03
24	8.09E+09	5.96E+09	5.42E+08	8.42E+06	3.27E+05	8.05E+02	9.50E+01	5.20E+01

Tabla 25. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiples de la CMI para la cepa 1 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días.

CMI = 0,0625	0	0.25 CMI	0.5 CMI	1 CMI	2 CMI	4 CMI	8 CMI	16 CMI
Concentración (µg/mL)	0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1
Tiempo (h)	CFU/mL							
0	2.96E+06	1.82E+06	6.51E+06	8.11E+06	2.86E+06	8.56E+06	1.78E+06	5.89E+06
1	1.12E+08	2.41E+07	5.42E+07	8.75E+06	6.60E+06	4.59E+05	1.03E+05	2.17E+04
2	9.98E+08	2.15E+09	6.88E+07	8.46E+06	8.46E+05	1.56E+06	2.40E+05	2.15E+04
4	5.56E+09	4.85E+08	1.13E+08	5.68E+06	5.12E+05	8.52E+05	9.06E+04	8.45E+04
8	1.06E+10	2.17E+08	5.42E+08	8.44E+06	6.59E+04	5.82E+04	8.96E+03	8.25E+03
24	1.98E+09	1.03E+09	1.98E+08	1.75E+06	9.56E+03	1.11E+04	7.42E+03	1.98E+03
Concentración (µg/mL)	0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1
Tiempo (h)	CFU/mL							
0	9.11E+06	4.29E+06	2.90E+06	6.86E+06	3.26E+06	5.30E+06	2.00E+06	6.02E+06
1	1.47E+09	6.33E+07	3.25E+08	9.86E+06	2.12E+06	7.49E+05	3.03E+05	8.75E+04
2	1.18E+09	8.18E+07	8.22E+07	8.76E+05	5.09E+05	1.45E+05	9.03E+04	6.33E+04
4	5.69E+09	2.17E+08	6.43E+07	1.00E+06	5.42E+05	3.26E+05	5.20E+04	1.03E+04
8	8.89E+09	3.27E+09	8.75E+07	8.41E+05	9.85E+05	8.52E+04	1.06E+03	5.41E+03
24	9.90E+09	3.27E+08	4.13E+08	9.46E+06	1.45E+04	9.86E+03	1.37E+03	1.05E+03

Tabla 26. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CMI para la cepa 2 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días.

CURVA PROMEDIO CON CONCENTRACIONES PROMEDIO CMI PROMEDIO 0.03125 – 0.0625								
	0	0.25 CMI	0.5 CMI	1 CMI	2 CMI	4 CMI	8 CMI	16 CMI
Concentraciones (µg/mL)		0.07030	0.14061	0.28125	0.56245	1.1249	2.2498	4.4996
Tiempo (h)	CFU/mL							
0	4.57E+06	3.04E+06	4.32E+06	4.48E+06	2.28E+06	5.44E+06	1.97E+06	6.15E+06
1	5.85E+08	9.03E+07	4.62E+07	1.06E+07	2.21E+06	3.86E+05	1.60E+05	4.58E+04
2	1.71E+09	3.80E+08	7.74E+07	3.55E+06	5.88E+05	3.33E+05	2.82E+05	2.53E+04
4	4.09E+09	9.83E+08	1.22E+08	3.19E+06	2.83E+05	1.26E+05	4.23E+04	9.84E+03
8	5.37E+09	1.18E+09	3.85E+08	2.18E+06	1.57E+05	2.60E+04	2.39E+03	2.98E+03
24	6.14E+09	1.24E+09	4.56E+08	7.95E+06	7.94E+04	3.59E+03	4.94E+02	3.13E+02

Tabla 27. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CMI para la cepa 2 obtenidas en dos ensayos *in vitro* en diferentes días.

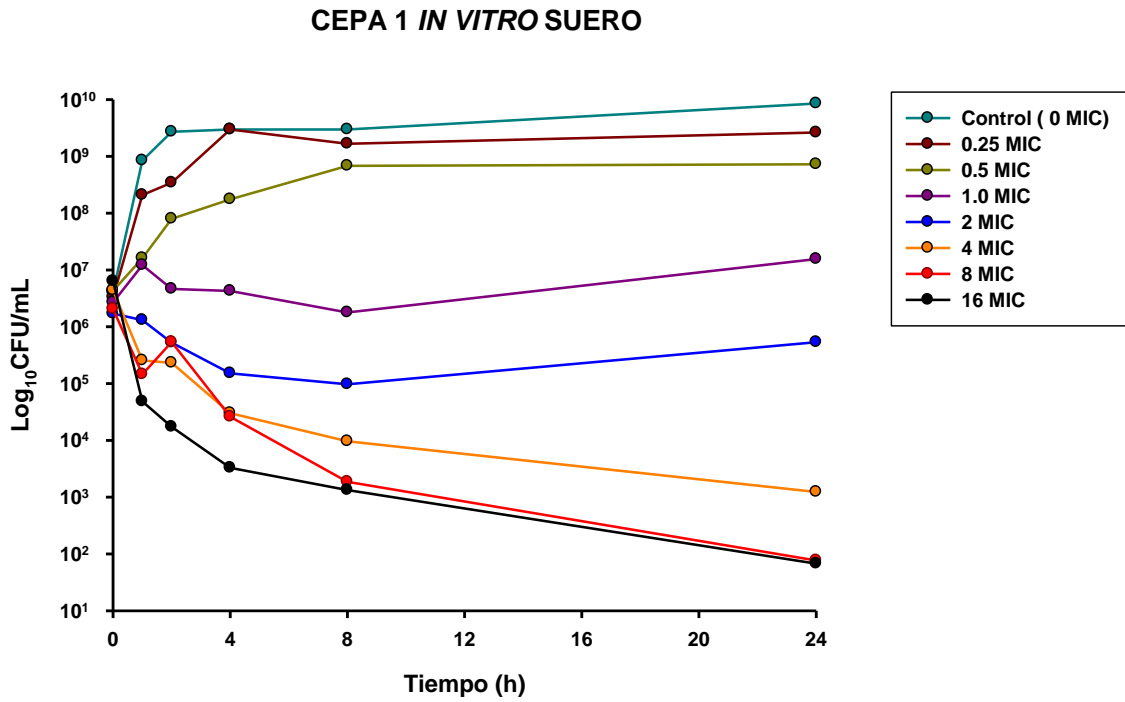


Gráfico 23.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiplos de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de dos ensayos *in vitro* en diferentes días.

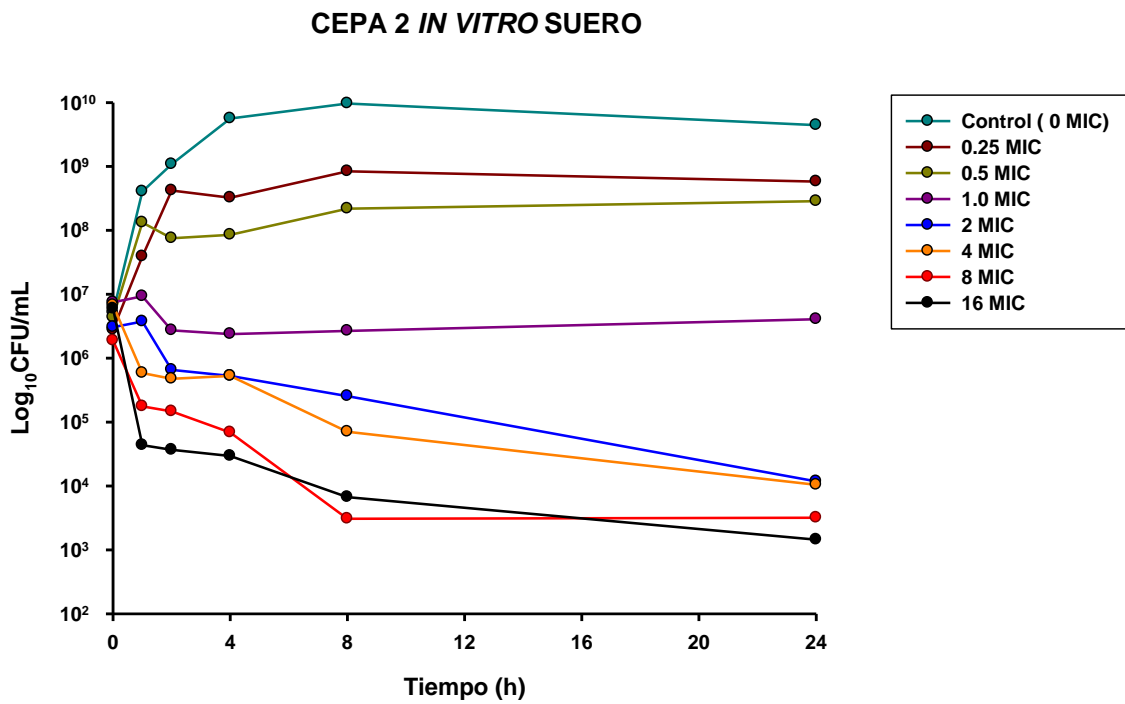


Gráfico 24.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiplos de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de dos ensayos *in vitro* en diferentes días.

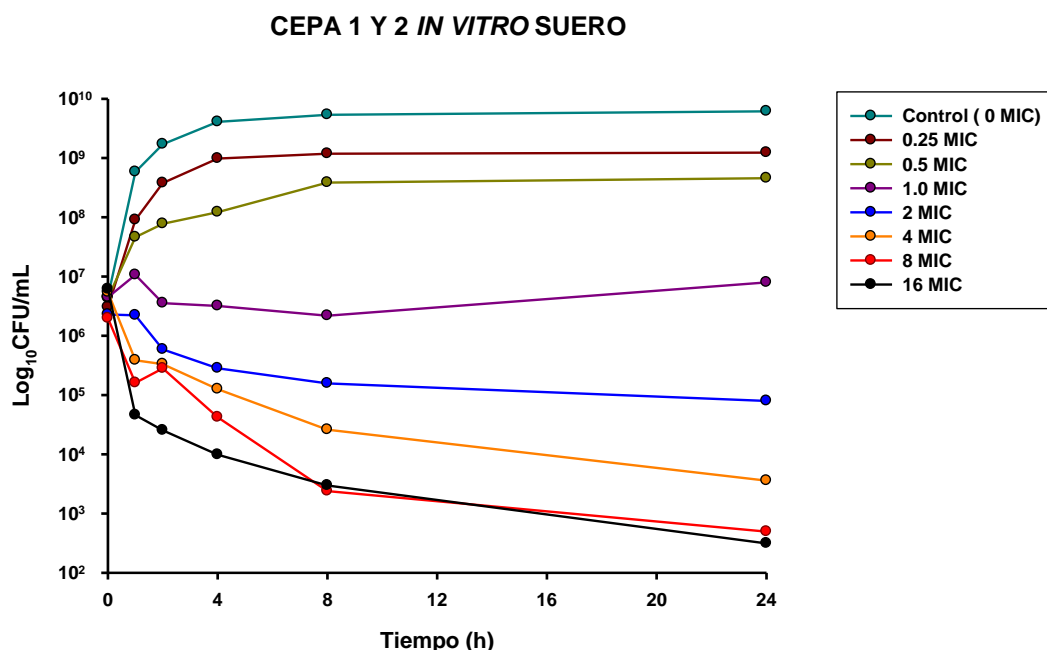


Gráfico 25.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones múltiplos de la CMI obtenida para ceftiofur en suero. Resultados promediados de cuatro ensayos *in vitro* en diferentes días.

Los valores de unidades formadoras de colonias de cada cepa, y promediadas, tras los ensayos *ex vivo* en muestras de suero tras la administración IV de ceftiofur a 2 mg/kg se muestran en las tablas 28, 29, y 30. Las figuras 26, 27 y 28 muestran las curvas de letalidad obtenidas, respectivamente.

	Tiempo de extracción de sangre (h)								
	0	1	2	4	12	24	32	48	72
Concentración promedio determinada por HPLC en cada tiempo de extracción de sangre (µg/mL)									
		9.3177	5.1932	3.2982	0.5701	0.1696	< LOD	< LOD	< LOD
Tiempo (h)	CFU/mL								
0	3.20E+06	3.32E+06	4.42E+06	6.15E+06	5.01E+06	4.32E+06	4.01E+06	3.02E+06	2.89E+06
1	4.26E+06	1.21E+05	1.10E+05	6.04E+04	3.28E+05	5.08E+05	6.39E+05	4.31E+06	4.87E+06
2	2.50E+07	1.23E+04	2.40E+04	3.48E+04	1.54E+05	1.32E+04	2.00E+06	1.35E+07	3.11E+07
4	1.25E+08	2.65E+03	5.31E+03	1.98E+03	1.67E+04	1.27E+04	1.24E+06	2.99E+07	9.62E+07
8	9.53E+08	9.52E+02	8.28E+02	2.82E+02	1.66E+03	2.75E+03	5.66E+05	6.82E+07	3.00E+08
24	1.98E+09	5.24E+01	5.55E+01	4.96E+01	6.86E+01	1.87E+02	1.89E+05	3.05E+08	1.04E+09

Tabla 28. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur intravenoso (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

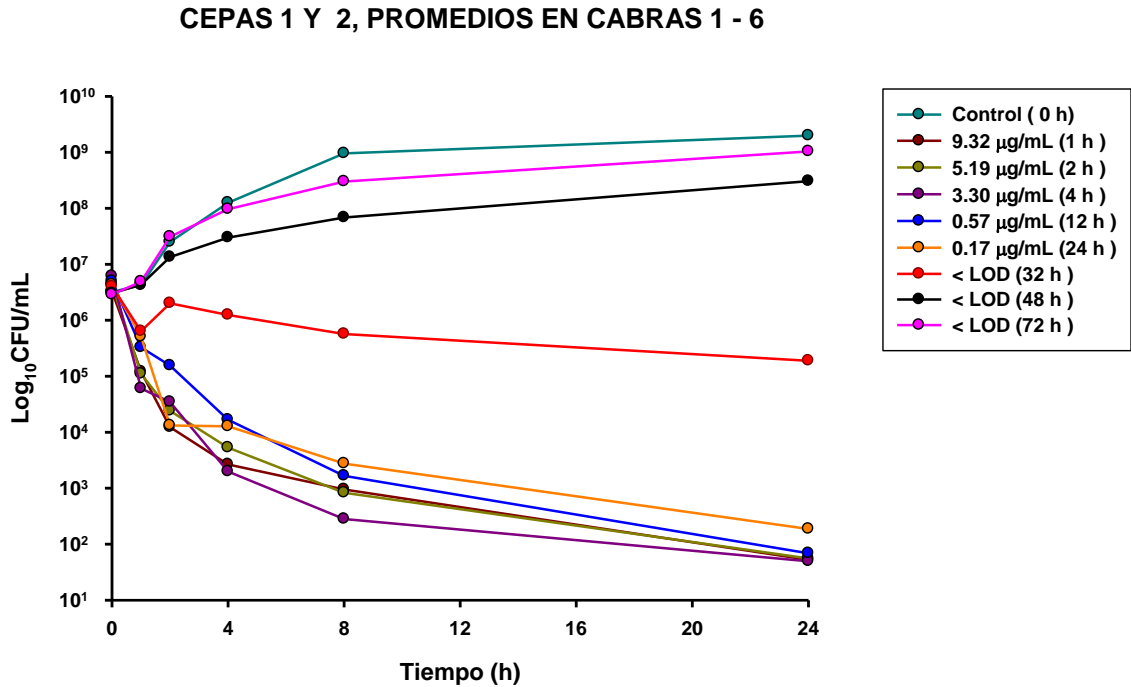


Gráfico 26.- Curvas de letalidad de *M. haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur intravenosos (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

		Tiempo de extracción de sangre (h)								
		0	1	2	4	12	24	32	48	72
		Concentración promedio determinada por HPLC en cada tiempo de extracción de sangre (µg/mL)								
			5.4880	5.4999	4.2662	0.7717	0.1726	< LOD	<LOD	<LOD
Tiempo (h)	CFU/mL									
0	3.20E+06	5.21E+06	4.46E+06	5.90E+06	3.20E+06	6.14E+06	2.86E+06	4.65E+06	8.04E+06	
1	4.26E+06	4.64E+04	2.42E+04	1.72E+04	7.90E+04	1.10E+05	7.42E+05	4.07E+06	8.87E+06	
2	2.50E+07	6.39E+03	5.39E+03	1.05E+04	1.80E+04	2.24E+04	4.81E+05	1.14E+07	2.71E+07	
4	1.25E+08	7.63E+02	1.39E+03	9.19E+02	3.05E+03	5.59E+03	6.67E+05	2.61E+07	1.52E+08	
8	9.53E+08	3.27E+02	2.74E+02	3.53E+02	3.71E+02	2.21E+03	6.96E+04	1.19E+08	3.57E+08	
24	1.98E+09	5.98E+01	4.60E+01	4.33E+01	6.18E+01	2.06E+02	7.85E+03	6.47E+08	1.01E+09	

Tabla 29. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur subcutáneo (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

CEPAS 1 Y 2, PROMEDIOS EN CABRAS 1 - 6

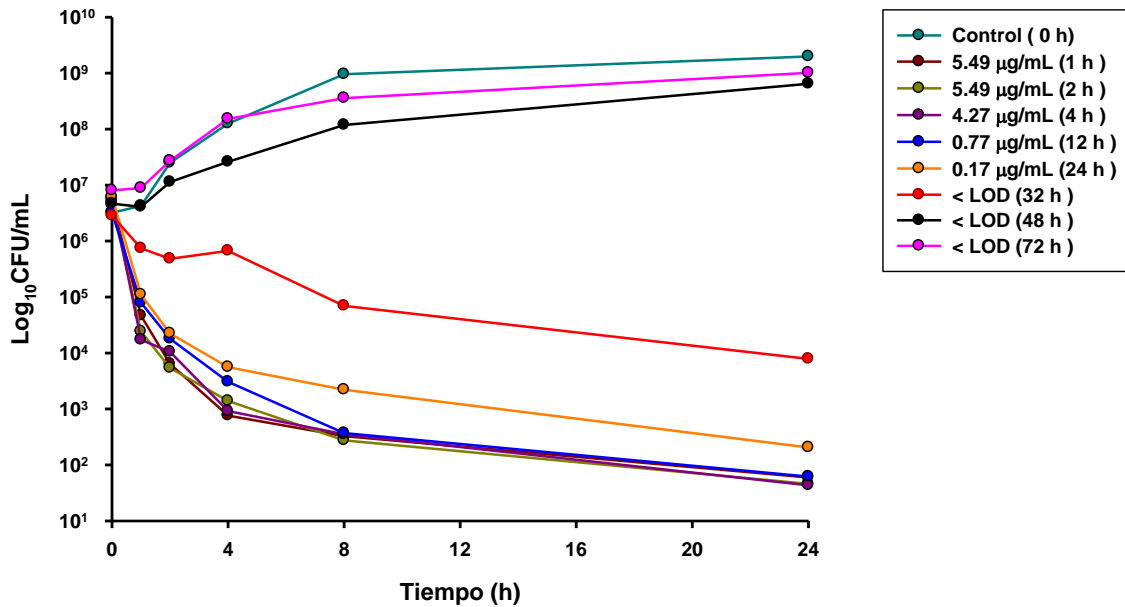


Gráfico 27.-Curvas de letalidad de *M. Haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur subcutáneas SC1 (2 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

		Tiempo de extracción de sangre (h)								
		0	1	2	4	12	24	32	48	72
		Concentración promedio determinada por HPLC en cada tiempo de extracción de sangre (µg/mL)								
			3.2845	6.0921	6.4440	3.4216	0.9119	0.5349	0.3331	0.2192
Tiempo (h)	CFU/mL									
0	3.20E+06	4.88E+06	1.83E+06	8.46E+06	2.66E+06	4.48E+06	2.86E+06	4.65E+06	7.45E+06	
1	7.31E+06	7.74E+04	3.08E+04	2.00E+04	2.00E+04	1.62E+04	1.73E+04	9.61E+04	2.91E+05	
2	1.88E+07	2.27E+04	1.85E+04	4.87E+03	2.26E+03	3.65E+03	1.81E+04	1.23E+05	5.56E+05	
4	2.61E+08	3.04E+03	1.97E+03	1.12E+03	6.86E+02	1.93E+03	6.44E+03	1.73E+04	3.37E+05	
8	1.75E+09	3.78E+02	4.64E+02	2.40E+02	3.20E+02	6.36E+02	1.14E+03	1.17E+04	3.07E+04	
24	4.69E+09	4.98E+01	4.26E+01	4.85E+01	5.18E+01	8.35E+01	4.53E+02	4.55E+03	5.15E+03	

Tabla 30. Unidades formadoras de colonias para *M. haemolytica* frente a diferentes concentraciones de ceftiofur subcutáneo SC2 (6 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

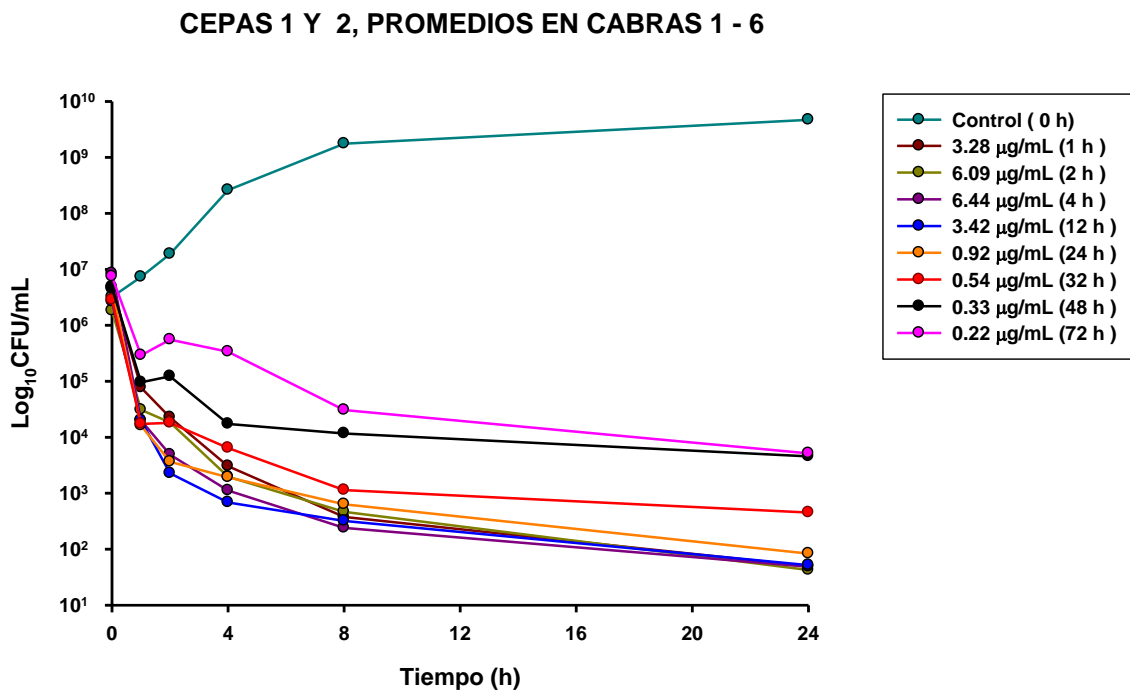


Gráfico 28.-Curvas de letalidad de *M. Haemolytica* frente a las concentraciones de ceftiofur subcutáneas SC2 (6 mg/kg) extraídas a diferentes tiempos y analizadas por HPLC. Resultados expresados como media geométrica de seis replicados (tres muestras por cepa) repetidas en tres días distintos.

5.-DISCUSIÓN.

5.1.- INTRODUCCIÓN.

Los valores de concentración plasmática de ceftiofur en cabras obtenidos tras la administración de la formulación convencional por las vías intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) así como tras la administración de una formulación de liberación controlada en polímero P-407 al 25 % con carboximetilcelulosa al 2% por vía subcutánea (SC2) han sido analizados mediante el método compartimental, siendo ajustados a modelos mono, bi y triexponenciales utilizando una ponderación con respecto a los inversos del cuadrado de la concentración. Esta ponderación es la que resulta más adecuada, ya que es la que mejor ajusta los valores finales de concentración, que son de los más bajos, con sus respectivos tiempos y permite obtener valores de semivida más aceptables (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a).

Para escoger el modelo farmacocinético compartimental, se ha recurrido al Criterio de Información de Akaike (AIC) que permite escoger una función lo más sencilla posible pero manteniendo un ajuste adecuado. De forma que el mejor modelo es el que presenta menor valor de AIC ya que este valor es directamente proporcional al número de parejas de datos, a la suma de cuadrados ponderados y al número de parámetros de ajuste.

Si el número de parejas de datos no varía, pero sí lo hacen la suma de cuadrados ponderados y el número de parámetros de ajuste, el valor de AIC depende de estos últimos. Estos dos factores tienen una relación inversa entre sí, ya que teóricamente la suma de cuadrados ponderados disminuye conforme aumentamos el número de parámetros de ajuste. Se llega pues a una situación de compromiso en la que el AIC disminuye si desciende la suma de cuadrados a escala logarítmica y aumenta conforme se incrementa el número de parámetros de ajuste a escala natural (Yamaoka y cols., 1978a).

En todos los casos, las concentraciones plasmáticas se ajustan mejor al modelo exponencial bicompartimental abierto sin absorción (dos exponenciales positivas tras la administración intravenosa) o con absorción de primer orden (tres exponenciales,

dos de ellas positivas y una negativa tras la administración subcutánea de las tres formulaciones).

En cuanto al estudio no compartimental, se ha seguido la regla lineal-trapezoidal en la fase ascendente y logarítmico-trapezoidal en la descendente sin ponderación.

5.2.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE CEFTIOFUR EN CABRAS.

5.2.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

Los valores de concentración plasmática de ceftiofur tras su administración IV, a la dosis de 2 mg/kg, en cabras (tabla 5, pag 103), se han sometido a un estudio mediante un análisis de varianza no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) con el fin de confirmar la no existencia de diferencias entre las mismas cuando se comparan las procedentes de los animales como fuente de variación, mientras que por otro lado, sí se encuentran diferencias significativas entre las concentraciones cuando la fuente de variación son los tiempos de extracción (tabla 6, pag 105). Ello valida la utilización de estos datos en el estudio farmacocinético que nos ocupa y que da como resultado que las concentraciones de ceftiofur, tras su administración IV, en cabras se ajustan a un modelo bicompartimental abierto en todos los casos (menor valor de AIC).

El modelo bicompartimental está de acuerdo con las características farmacocinéticas de las cefalosporinas y, en general de los beta-lactámicos, que presentan una buena distribución orgánica aunque con escasa capacidad de penetración intracelular (Swati y cols., 2010; Patel y cols., 2010).

Aunque los estudios de administración de ceftiofur en esta especie son muy escasos en la bibliografía, sobre todo en cuanto a la administración intravenosa, también se ha obtenido un mejor ajuste del fármaco al modelo bicompartimental en cabras (Courtin y cols., 1997). Otros estudios realizados tras la administración intravenosa de ceftiofur en distintas especies animales, también ajustan a un modelo

bicompartimental: ovejas (Craigmill y cols., 1997), camellos (Goudah, 2007), llamas (Drew y cols., 2004a) y ciervos (Drew y cols., 2004b).

El modelo bicompartimental abierto fue introducido por T. Teorell en 1937 y posteriormente divulgado por J. Loo y S. Riegelman (1968). Este modelo intenta reflejar el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo. Se caracteriza por considerar al organismo compuesto por dos compartimentos, uno central correspondiente a los tejidos en los que se alcanza un rápido equilibrio en la distribución del fármaco (puede considerarse instantánea) y uno periférico que corresponde a los tejidos en los que el equilibrio en la distribución precisa un tiempo más o menos dilatado para alcanzarse (Doménech y cols., 1997). Dependiendo de que el proceso de eliminación se produzca desde el compartimento central, o desde el compartimento periférico, se obtendrán distintos modelos posibles. En nuestro caso hemos considerado que la eliminación se produce desde el compartimento central.

El modelo bicompartimental abierto tras una dosis intravenosa, viene definido por la siguiente ecuación: $C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2 t}$ (1)

Esta ecuación adquiere diferentes valores para cada animal (tabla 7, pag 106), es por ello que para hallar la ecuación que mejor define la evolución de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur en la cabra, se deben llevar a cabo estudios estadísticos que permitan calcular los valores medios para cada uno de los parámetros que intervienen en la misma. Dichos valores promedio se muestran en la tabla 7.

Por consiguiente, la ecuación media que define la evolución de las concentraciones plasmáticas experimentales, en la cabra tras la administración intravenosa, de una dosis única de 2 mg/kg de ceftiofur, adquiere el siguiente valor:

$$C = 28641,89 \times e^{-3,19t} + 178,85 \times e^{-0,16t} \quad \text{mg/L} \quad (2)$$

La representación semilogarítmica de las concentraciones individuales experimentales (gráfico 1, pag 104), pone de manifiesto que los niveles de ceftiofur descienden rápidamente en una fase inicial para después hacerlo de forma más

paulatina, dando lugar a una segunda fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 32 horas tras la administración).

Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (gráfico 2, pag 105), en las que se diferencia una fase lineal correspondiente a la parte media y final de la curva, y una fase inicial que es susceptible de descomponerse en otra recta de pendiente más pronunciada que la anterior.

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión biexponencial ya indicada en la ecuación 2. Por tanto, la desaparición de ceftiofur del suero de cabra, está regida por dos constantes híbridas de disposición. La primera de ellas, o constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución y la segunda o constante de disposición lenta (λ_z), los procesos de eliminación. Una vez alcanzado el equilibrio en la distribución, la constante de disposición rápida (λ_1), deja de tener influencia práctica, por lo que se puede asumir que la desaparición de ceftiofur del suero en cabras, queda determinada por la constante de la última fase o constante de disposición lenta (λ_z). Por definición, el valor de λ_1 es siempre superior al de λ_z (Doménech y cols., 1997).

El descenso rápido inicial de las concentraciones plasmáticas, implica una rápida distribución a los tejidos, durante la primera fase, seguida de una distribución más lenta en la siguiente, detectándose concentraciones de ceftiofur en suero hasta las 32 horas.

5.2.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

A continuación se van a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos de ceftiofur tras su administración intravenosa a cabras (tablas 8 y 9, pags 107 y 108).

5.2.2.1.- CONSTANTES HÍBRIDAS DE DISPOSICIÓN RÁPIDA Y LENTA.

Las constantes λ_1 y λ_z se denominan constantes híbridas de disposición rápida y lenta por englobar los procesos de distribución y eliminación del fármaco (Doménech y cols., 1997), si bien la primera participa preferentemente en la distribución mientras que la segunda lo hace en la eliminación. Ambas son de primer orden (Pla y del Pozo, 1974).

En el presente estudio, los valores medios de estas constantes para el ceftiofur han sido de $0,65 \text{ h}^{-1}$ y $0,14 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y λ_z , respectivamente. Un valor menor para λ_1 fue obtenido en un estudio realizado con el mismo fármaco en cabras, concretamente $0,08 \text{ h}^{-1}$ y mayor para λ_z con un valor de $0,43 \text{ h}^{-1}$ respectivamente (Errecalde y cols., 2006).

Las constantes híbridas de disposición pueden relacionarse mediante la razón λ_1/λ_z , que informa cuál de ellas controla principalmente los procesos de distribución y eliminación (Pla y Obach, 1982). Así, cuanto más elevado sea dicho cociente, tanto más bicompartimental puede considerarse la distribución del fármaco. En nuestro estudio, una relación λ_1/λ_z con un valor de $4,65 (\pm 1,56)$, es indicativo de la diferencia existente entre ambas fases y nos indica que la distribución de ceftiofur es, preferentemente, bicompartimental y que la constante λ_z es la que controla principalmente los procesos anteriormente citados, ya que los regula durante más tiempo.

En la cabra, para otras cefalosporinas también se han obtenido valores de estas constantes. En el caso de cefuroxima, son de $2,8 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y $0,47 \text{ h}^{-1}$ para λ_z (Abo El-Sooud, 2000). Con ceftriaxona (Ismail, 2005) se obtiene un valor superior para λ_1 ($5,69 \text{ h}^{-1}$) y casi igual para la fase de distribución lenta ($0,48 \text{ h}^{-1}$). Muy similar a los anteriores es el valor de λ_z para ceftazidima ($0,5 \text{ h}^{-1}$; Rule y cols., 2011), sin embargo, en el caso de cefalexina el valor obtenido por Atef (1990) es superior ($2,47 \text{ h}^{-1}$).

En llamas, ceftiofur presenta valores para λ_1 de $1,18 \text{ h}^{-1}$ y para λ_z de $0,09 \text{ h}^{-1}$ (Drew y cols., 2004a), de $2,72 \text{ h}^{-1}$ y $0,13 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y λ_z en alpacas en el mismo estudio, y de $1,45 \text{ h}^{-1}$ y $0,07 \text{ h}^{-1}$ en ciervos (Drew y cols., 2004b).

5.2.2.2.- MICROCONSTANTES.

Las constantes λ_1 y λ_z , no son las verdaderas constantes de distribución y eliminación, ya que ambas participan en los dos procesos, las denominadas microconstantes son las que realmente los regulan.

En el modelo bicompartimental, considerando que la eliminación del fármaco se produce desde el compartimento central, existen tres microconstantes: la constante de transferencia del compartimento central al compartimento periférico (k_{12}), la constante de retorno del compartimento periférico al central (k_{21}) y la constante de eliminación desde el compartimento central (k_{10}). Podemos observar esquemáticamente en la figura 11 (pag 125), los procesos de transferencia del fármaco entres los dos compartimentos, central y periférico, y el de eliminación desde el central.

En este modelo, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central, desde el cual pasa al compartimento periférico de acuerdo con un proceso cinético de primer orden, regido por la constante de velocidad k_{12} y retorna hacia el compartimento central regido por la constante k_{21} . Desde el compartimento central se produce la eliminación, también regida por una constante de primer orden la constante k_{10} (Doménech y cols., 1997).

Los valores medios obtenidos para dichas constantes, en el caso de ceftiofur en la cabra, son $k_{12} = 2,02 \text{ h}^{-1}$, $k_{21} = 0,56 \text{ h}^{-1}$ y $k_{10} = 0,78 \text{ h}^{-1}$ (tabla 3). Esto pone de manifiesto que para cada animal la constante de eliminación desde el compartimento central (k_{12}) es la que adquiere un mayor valor, indicando un paso significativo del ceftiofur desde el compartimento central al periférico. Este hecho parece indicar que el fármaco tiene buen acceso al compartimento periférico sin que se produzca una retención significativa.

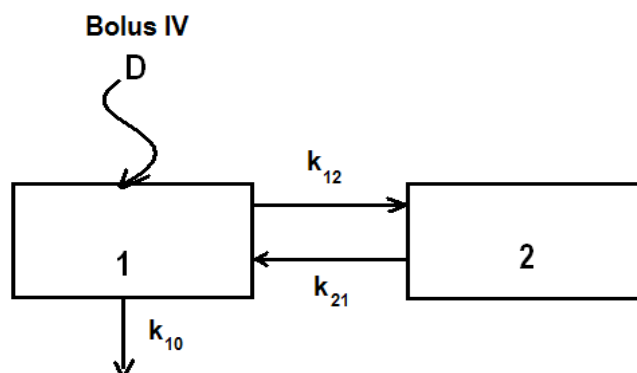


Figura 11.- Representación esquemática del modelo bicompartimental abierto tras la administración intravenosa de un fármaco.

Si observamos estas constantes podemos establecer relaciones de interés, como la relación λ_z/k_{10} , que alcanza un valor de $2,77 (\pm 2,03)$, y señala una eliminación global del antibacteriano desde todo el organismo, regida por una constante λ_z que siempre es inferior a la verdadera constante de eliminación (k_{10}), lo que confirma de nuevo la adecuación de la disposición de ceftiofur a un modelo bicompartimental.

Del estudio de la relación k_{12}/k_{10} , se obtiene un valor de $1,43 (\pm 1,79)$. Como se puede observar, este valor es superior a 1 y k_{12} casi duplica el valor de k_{10} lo vuelve a corroborar con esta relación el carácter bicompartimental de ceftiofur tras su administración IV en la cabra.

Si estudiamos la relación entre la constante de transferencia y retorno, desde el compartimento periférico k_{12}/k_{21} , esta adquiere el valor de $1,99 (\pm 1,62)$. Este resultado indica que el acceso del fármaco desde el compartimento central al periférico es mayor que el posterior retorno del mismo.

Del análisis de la relación k_{21}/k_{10} , se obtiene un valor de $0,60 (\pm 0,19)$, por lo que el retorno del fármaco, del compartimento periférico al compartimento central no condiciona demasiado su eliminación. Esto concuerda con que no existe retención del fármaco en el compartimento periférico.

5.2.2.3.- SEMIVIDA

La semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda 1}$) para ceftiofur, ha sido de 0,21 horas, y la de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda 2}$) de 4,21 horas (tabla 7, pag 106). Esta última se considera como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982, Rowland y Tozer, 2011).

El valor de la semivida de la fase de disposición rápida de nuestro estudio es significativamente superior al obtenido para el mismo fármaco en cabras (0,12 h; Errecalde y cols., 2006). El valor de la semivida ($t_{1/2\lambda 2}$) obtenido en nuestro estudio (4,21 h) es superior al obtenido también en cabras (1,63 h; Errecalde y cols., 2006) y parecido al valor de la semivida en la fase de disposición lenta obtenido por Courtain y cols. (1997) en cabras lactantes tras administrar 2,2 mg/kg de ceftiofur sódico (3,88 h).

Si comparamos con los valores obtenidos en la misma especie con otras cefalosporinas, en el caso de Rule y cols. (2011) en cabras lactantes obtuvieron para ceftazidima una semivida de 1,6 h frente a 2,3 horas en cabras no lactantes, en ambos casos significativamente inferior alas 4,21 horas de nuestro estudio. En el caso de la cefalexina, Ambros y cols. (2010) obtuvieron en cabras lactantes una semivida de 0,4 h. Valores inferiores también se obtuvieron por Ismail (2005) en cabras lactantes para ceftriaxona (1,44 h). Especialmente corta es la semivida obtenida para cefotaxima por Atef y cols. (1990) que obtuvieron una semivida tras la administración IV de cefotaxima de 0,37 h.

Comparando con los de otras especies animales, el valor es muy parecido al obtenido para otra especie de pequeños rumiantes como es la oveja (4 h; Craigmill y cols., 1997), sin embargo, en caballos el valor obtenido es bastante superior (21,5 h; Collard y cols., 2011), en potros la semivida obtenida fue de 7,78 h (Meyer y cols., 2008) y en camellos fue de 3,18 h (Goudah, 2007).

5.2.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA.

El área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC), es un parámetro que permite calcular el aclaramiento plasmático y la biodisponibilidad del fármaco tras su administración extravascular. Se calcula integrando, entre tiempo cero e infinito, la curva de concentración plasmática-tiempo, y puede hacerse tanto por análisis compartimental (a partir de la ecuación general del proceso) o por análisis no compartimental (métodos trapezoidal, logarítmico trapezoidal, o mixto, lineal en la fase ascendente y logarítmico en la fase descendente de la curva de concentración plasmática a partir de la curva experimental) como en este caso. Yamaoka y cols. (1978b) definen los momentos estadísticos para las curvas de concentración plasmática y el AUC corresponde al momento cero.

El valor de AUC obtenido para ceftiofur en cabras es de 47058,06 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (tabla 4, pag 91), este valor es superior a los 27082 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ obtenido por Courtain y cols. (1997) también en cabras lactantes a una dosis de 2,2 mg/kg. Sin embargo, en cabras también lactantes Errecalde y cols. (2009) obtienen un valor de menos de la mitad con la misma dosis (11464 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$). Hay que tener en cuenta que el AUC es un parámetro que depende de la dosis administrada, por lo que habrá que tener cautela al comparar con otros estudios en los que la dosis de ceftiofur administrada es distinta. Respecto a valores de AUC obtenidos en otras especies tras la administración de ceftiofur en las mismas condiciones de dosis y vía que en nuestro estudio, podemos destacar que se han encontrado valores parecidos de 26000 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ en ovejas (Craigmill y cols., 1997), 12300 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ en caballos (Collard y cols., 2011) pero con una dosis de la mitad (1 mg/kg) por lo que si ajustamos el valor a la dosis de nuestro estudio asumiendo linealidad, el valor también se acerca bastante. Por otro lado en postros (Meyer y cols., 2008) el valor es significativamente mayor 68100 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, aunque aquí la dosis es de 5 mg/kg. En camellos se obtuvo un valor de 70530 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (Goudah, 2007).

En la cabra, con otras cefalosporinas, se han obtenido valores de AUC superiores para cefuroxima (1,15 veces, Abo El-Sood., 2000) y ceftriaxona (1,78 veces; Ismail, 2005) e inferiores para: cefquinoma (5,8 veces, Litterio, 2013) y cefalexina (1,87

veces; Ambros y cols., 2010). Las dosis utilizadas fueron de 205 mg/kg para cefuroxima, de 20 mg/kg para ceftriaxona, 2 mg/kg para cefquinoma y de 10 mg/kg para cefalexina.

5.2.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA.

El tiempo medio de residencia o MRT es un parámetro farmacocinético que tiene una significación similar al tiempo de semivida ya que equivale a la inversa de una constante de eliminación y se obtiene dividiendo el area bajo la curva tiempo-concentración plasmática (AUMC) entre el area bajo la curva (AUC). Ambas areas pueden obtenerse por integración entre cero e infinito de las curvas compartimentales, o bien como hemos señalado para el AUC mediante análisis no compartimental por medio del cálculo de las áreas trapezoidales como es nuestro caso. Se corresponde con el momento estadístico uno (Yamaoka y cols., 1978b)

En el presente estudio se ha obtenido un valor de MRT de 4,27 horas (tabla 8, pag 107). Este resultado es algo superior, aunque no difiere mucho del obtenido por Courtain y cols. (1997) en cabras lactantes y no lactantes (3,85 h), aunque en el caso de Errecalde y cols., (2009) también en cabras obtuvo un valor inferior de 2,74 horas. El MRT obtenido para este mismo fármaco en otras especies por vía intravenosa fue de 5,75 h en ovejas (Craigmill y cols., 1997), en potros bastante superior (9,75 h; Meyer y cols., 2008) y parecido aunque algo inferior en camellos (3,68 h; Goudah, 2007).

En cuanto a otras cefalosporinas estudiadas en cabras, se han obtenido MRT inferiores para cefuroxima (1,81 h; Abo El-Sood, 2000), Ceftriaxona (1,56 h; Ismail, 2005), cefquinome (1,51 h; Litterio, 2013) y cefalexina (0,35 h; Ambross y cols., 2010).

5.2.2.6.- ACLARAMIENTO PLASMÁTICO.

El aclaramiento plasmático (Cl) puede calcularse a partir de las curvas de niveles plasmáticos, recurriendo a métodos modelo-dependientes, basados en los modelos compartimentales y fisiológicos, o utilizando métodos modelo-

independientes basados en la estimación del AUC (Doménech y cols., 1997). En nuestro estudio, se ha calculado el CI en función del área bajo la curva mediante análisis no compartimental. El valor obtenido ha sido de 0,04 L/kg/h (tabla 8) que es muy inferior al obtenido por Errecalde y cols. (2009) de 0,20L/kg/h, de 0,08 L/kg/h en el caso de cabras lactantes (Courtain y cols., 1997) y de 0,06 L/kg/h en el mismo estudio para cabras no lactantes.

Se han encontrado valores superiores a los descritos por nosotros en otros animales. Así, se obtuvieron valores de CI de 0,07 L/kg/h en potros (Meyer y cols., 2008) y de 0,01 en caballos (Collard y cols., 2011). Por otro lado, en camellos el valor obtenido fue de 0,03 L/kg/h (Goudah, 2007).

Estudios con otras cefalosporinas en cabras señalan valores superiores para cefuroxima, 0,37 L/kg/h (Abo El-sooud y cols., 2000) y para ceftriaxona 0,23 L/kg/h (Ismail, 2005), 0.25 L/kg/h para cefquinome (Litterio, 2013) y 0.4 L/kg/h para cefalexina (Ambros y cols., 2010).

5.2.2.7.- VOLÚMENES DE DISTRIBUCIÓN APARENTE.

Hemos obtenido dos valores de los volúmenes de distribución para ceftiofur (tabla 8, pag 107), el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) adquiere un valor de 0,18 L/kg, en tanto que el de distribución aparente en función del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (V_z), alcanza un valor de 0,31 L/kg. Como se puede observar estos valores indican que el fármaco tiene una distribución limitada en tejidos y fluidos en la especie objeto de nuestro estudio. Las diferencias obtenidas entre los volúmenes de distribución son consecuencia de los métodos empleados para su cálculo. En general, el volumen de distribución es útil para transformar concentraciones en cantidades de fármaco en el organismo y viceversa. El V_{ss} es válido en aquellos momentos en que la curva de nivel plasmático está en zonas próximas a la inflexión y, por supuesto, durante la misma ($V_{ss} = V_c + V_p$) al considerar un equilibrio estacionario en la distribución, en tanto que el V_z es válido en una zona más amplia de la curva de nivel plasmático y, de alguna manera, minusvalora la fase inicial ya que

asume una pérdida de fármaco en función de λ_z , asimilándose a lo que sería equivalente a un modelo monocompartimental (Doménech y cols., 1997).

No todas las publicaciones señalan estos dos volúmenes de distribución aparente, siendo tal vez el V_{ss} el que más aparece. Así, Errecalde y cols. (2006) describen unos valores de 0,38 L/kg para V_{ss} y de 0,48 L/kg para V_z . Courtain y cols. (1997) solamente ofrecen el valor del V_{ss} en cabras lactantes (0,31 L/kg) y no lactantes (0,25 L/kg) tras la administración de prácticamente la misma dosis de 2,2 mg/kg.

Otros estudios realizados con ceftiofur han descrito valores de V_{ss} para otras especies animales, aunque son inferiores a los presentados en nuestro estudio, concretamente en caballos 0,007 L/kg (Collard y cols., 2011), potros 0,74 L/kg para V_{ss} y 0,83 L/kg para V_z (Meyer y cols., 2008) y camello para V_{ss} (0,13 L/kg; Goudah, 2007).

Estudios de otras cefalosporinas en cabras han señalado valores de V_z superiores para cefuroxima (0,79 L/kg, Abo El-sooud, 2000) y cefquinome (0,58 L/kg; Litterio, 2013). Un valor similar fue obtenido por Ambros y cols. (2010) para cefalexina (0,20 L/kg).

En relación al volumen de distribución en el estado estacionario (V_{ss}) con otras cefalosporinas en cabra, se han señalado valores en general superiores a los presentados en nuestro estudio para diferentes especies animales. En ellas se han observado valores de 0,67 L/kg para cefuroxima (Abo El-sooud, 2000), 0,37 L/kg para ceftriaxona (Ismail, 2005), 0,38 para cefquinome (Litterio, 2013), y un valor similar al de nuestro estudio para cefalexina de 0,13 L/kg en el estudio realizado por Ambros y cols. (2010).

En general, los resultados observados en el estudio y en otros estudios muestran una razonable distribución de este grupo de betalactámicos en los tejidos de los animales estudiados.

5.3.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE CEFTIOFUR EN CABRAS (SC1).

5.3.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur, tras la administración subcutánea de 2 mg/kg en cabras (tabla 9, pag 108), se ha ajustado, igual que tras la administración intravenosa, a un modelo bicompartimental abierto pero en este caso con absorción de primer orden. Como en el caso anterior se han ponderado los datos con respecto a los inversos de los cuadrados de las concentraciones. En todos los casos estudiados el valor de AIC indica un mejor ajuste a este modelo bicompartimental abierto (triexponencial).

Igual que en la administración intravenosa, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (tabla 10, pag 110), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que la única fuente de variación es el tiempo y no los animales, por lo que se manifiesta homogeneidad en las concentraciones a un tiempo determinado para todos los animales.

En la literatura no existen estudios compartimentales en cabras tras la administración de ceftiofur vía subcutánea en una formulación convencional como es el caso de nuestro estudio, los estudios de administración de ceftiofur vía SC están circunscritos a la formulación subcutánea microcristalina que no resulta comparable a esta, y cuya comparación dejaremos para el apartado de estudio de la formulación SC2.

Tampoco hemos encontrado estudios compartimentales para otras cefalosporinas en cabra en la literatura científica. Otros estudios, también con ceftiofur en otras especies animales muestran sólo análisis no compartimentales.

Cuando se administra un fármaco por vía extravascular (oral, intramuscular, subcutánea, transdérmica, etc.) el modelo bicompartimental puede esquematizarse como se indica en la figura 12 (pag 158), en la cual se considera la variación instantánea de concentración en el compartimento central:

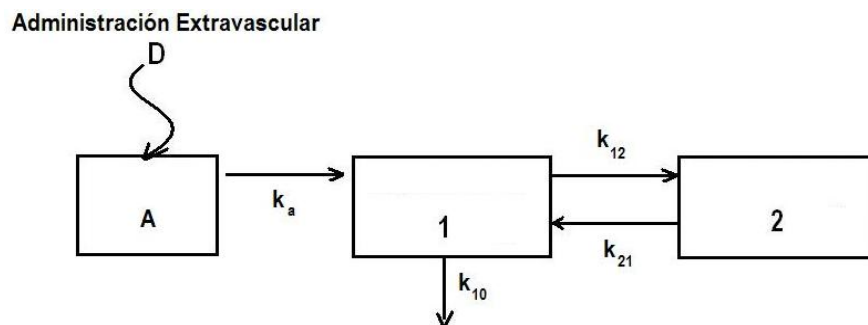


Figura 12.- Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración extravascular de un fármaco.

Este modelo consta de dos compartimentos con una zona de depósito del fármaco (zona A) desde la que se produce la absorción. El modelo bicompartimental abierto tras la administración de una dosis subcutánea, viene definido por la siguiente ecuación:

$$C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2 t} - C_a \cdot e^{-k_a t} \quad (6)$$

Dicha ecuación adquiere valores distintos en cada animal, los cuales se muestran en la tabla 7 (pag 106) junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Por tanto, la ecuación que describe la evolución de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur, tras su administración subcutánea, obtenida con los parámetros medios, adopta el siguiente valor:

$$C = 4542,99 \times e^{-0,56t} + 27726,27 \times e^{-0,14t} - 23183,28 \times e^{-0,94t} \quad \text{mg/L(7)}$$

La representación directa de las concentraciones medias experimentales para cada animal en escala semilogarítmica y para las concentraciones medias (Gráficos 3 y 4, pags 109 y 110), pone de manifiesto que los niveles de ceftiofur aumentan rápidamente durante la primera fase de absorción del fármaco alcanzando su máximo alrededor de las 1 – 1,5 horas, para descender rápidamente en la fase posterior, hasta las 24 horas. Aunque la visualización de los gráficos junto con los ajustes son las estrategias más utilizadas para elegir el modelocompartimental al que mejor se

ajustan unos datos, la visualización de la gráfica en nuestro caso, sobre todo de la representación semilogarítmica de las concentraciones experimentales medias, no nos muestra un claro punto de inflexión que se podría advertir más o menos entre las 4-6 horas tras la administración.

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión triexponencial ya indicada en la ecuación 7, siendo representativa cada exponencial de los procesos que sufre el fármaco: absorción, regida por la constante de absorción (k_a), disposición rápida, descrita por la constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución, y la disposición lenta que viene dada por la constante de disposición lenta (λ_2), que rige los procesos de eliminación principalmente.

La ecuación 7 resulta válida para definir la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur en cabras, tras su administración subcutánea. Sin embargo, esta ecuación no es válida, para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la evolución del fármaco en la cabra, ya que estos últimos vienen definidos por el estudio tras la administración intravenosa. Sin embargo, vamos a comentar algunos parámetros obtenidos de esta última ecuación, ya que pueden dar una información interesante.

5.3.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental para ceftiofur, se muestran en las tablas 11 y 12 (pag 111), respectivamente, y van referidos a cada animal, junto con los valores medios y estadísticos asociados.

5.3.2.1.- SEMIVIDA.

Al igual que en la vía intravenosa, se ha calculado el tiempo de semivida de las fases de disposición rápida ($t_{1/2\lambda_1}$) y de disposición lenta ($t_{1/2\lambda_2}$), considerado este último valor como tiempo de semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y

Perrier, 1982). Estos valores son de 1,23 y 5,1 h, respectivamente (tabla 11, pag 111). Estos valores son superiores, aunque similares, a los obtenidos tras la administración intravenosa, lo cual, puede ser indicativo de que, *a priori*, el proceso de absorción, no se convierte en un factor limitante de la eliminación como en los modelos *flip-flop*.

Como hemos señalado anteriormente, existe muy poca literatura científica sobre la administración de ceftiofur en cabras y otras especies animales. Vía SC solamente se ha descrito la farmacocinética de ceftiofur en iguanas donde se obtuvo una semivida de 15,5 horas, bastante superior a la de nuestro estudio (Benson y cols., 2003).

En cabras, se han presentado también escasos estudios para la vía SC tras la administración de otras cefalosporinas, solamente se ha descrito por esta vía en esta especie la cefotaxima (Atef, 1990), para la que se obtuvo un valor de $t_{1/2\lambda z}$ de 1,16 h, bastante inferior a las 5,10 horas de nuestro estudio.

Es importante señalar, que la ausencia de estudios por esta vía se debe fundamentalmente a que la vía SC ha sido ampliamente estudiada para este fármaco con la formulación microcristalina “Long-Acting”, y cuando no se utiliza esta vía se suele utilizar la vía IM.

5.3.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

Otro parámetro a tener en cuenta tras la administración subcutánea es el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima o tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$). El valor de este parámetro ha sido de 1,94 h (tabla 11, pag 111). El $T_{m\acute{a}x}$ 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.

Dentro de la escasa literatura científica sobre la administración de ceftiofur vía SC, solamente se ha descrito la farmacocinética de ceftiofur vía SC en iguanas donde se

obtuvo un $T_{m\acute{a}x}$ de 0,63 h, inferior al de nuestro estudio (Benson y cols., 2003), y en potros neonatos se obtuvo un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 0,75 h (Hall y cols., 2011).

En cabras, se han presentado también escasos estudios para la vía SC tras la administración de otras cefalosporinas, solamente se ha descrito por esta vía en esta especie la cefotaxima (Atef, 1990), para la que se obtuvo un valor de $t_{1/2\lambda z}$ de 1,16 h, bastante inferior a las 5,10 horas de nuestro estudio.

En cuanto a la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el valor obtenido para ceftiofur en cabra, ha sido de 5691 $\mu\text{g/L}$ (tabla 11, pag 111). Al igual que en los parámetros anteriores, no existe posibilidad de comparación para la misma vía de administración en cabras u otras especies, solamente en potros neonatos se ha descrito un valor de 13000 $\mu\text{g/L}$ (Hall y cols., 2011). En cuanto a otras cefalosporinas, Atef (1990) administra cefotaxima en cabras, pero no describe la $C_{m\acute{a}x}$.

5.3.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN.

La ecuación 7 define la evolución de las concentraciones plasmáticas, tras la administración subcutánea de ceftiofur en cabras. Las constantes de absorción y eliminación, que se extraen de dicha ecuación no son reales, sino aparentes. En este caso, la constante de absorción aparente (k_a) es 0,39 h^{-1} (tabla 11, pag 111) y la semivida asociada a la misma ($t_{1/2k_a}$) de 0,73 h.

Si comparamos el valor obtenido para $t_{1/2k_a}$ con el obtenido para $t_{1/2\lambda z}$ intravenoso, que es 4,21 h (tabla 7, pag 106), podemos observar como este último es 5 veces mayor, lo que indica que la fase de absorción no condiciona la eliminación de ceftiofur en la cabra.

No se dispone de valores de k_a para ceftiofur tras su administración subcutánea en solución acuosa en otras especies, salvo el caso de la administración subcutánea de la formulación microcristalina que reservamos para su comparación en el caso de la formulación controlada SC2. Solo se dispone de datos de administración intramuscular en león marino (Meegan y cols., 2013) con un valor de 0,097 h^{-1} a una dosis de 6,6 mg/kg, y en oveja con un valor de 0,095 h^{-1} (Craigmill y cols., 1997). Como podemos

observar, estos últimos valores son inferiores para k_a y $t_{1/2ka}$ respectivamente, a los hallados en nuestro estudio.

Por el contrario, en cabras y tras la administración subcutánea de otras cefalosporinas, no existen descritos datos de K_a .

5.3.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD.

El AUC, obtenida tras la administración subcutánea, alcanza un valor de 39884,14 μ g·h/L (tabla 12, pag 111). Este valor es muy similar al obtenido en el estudio de Hall y cols. (2011) en potros neonatos, en el que, corrigiendo la dosis, se obtiene un valor de 36400 μ g·h/L.

El valor del AUC permite calcular la biodisponibilidad (F) del fármaco, tras la administración subcutánea, mediante la siguiente ecuación:

$$F\% = 100 \cdot \frac{AUC_{0\infty}^{EV} / D_{EV}}{AUC_{0\infty}^{IV} / D_{IV}} \quad (8)$$

Donde el subíndice *EV* hace referencia a las vías extravasculares empleadas, en nuestro caso la subcutánea en formulación convencional (SC1) y la polimérica (SC2).

La biodisponibilidad obtenida es muy elevada, del orden del 85,16% \pm 10,24 (tabla 12, pag 111).

En cabras, no existen datos de biodisponibilidad de la sal sódica de ceftiofur, solamente hemos encontrado un dato de biodisponibilidad del 97,6% vía intramuscular en cabras lactantes tras la administración de 2.2 mg/kg de ceftiofur sódico (Errecalde y cols., 2009).

Otras cefalosporinas estudiadas en cabras, tienen una biodisponibilidad también alta, como es el caso de la cefotaxima que tras la administración subcutánea obtuvo una biodisponibilidad del 125% (Atef, 1990).

5.3.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT_{sc1}) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE ABSORCIÓN (MAT_{sc1}).

El MRT_{sc1} obtenido presenta un valor medio de 6,29 h (tabla 12, pag 111). Éste parámetro es 1,4 veces mayor que el descrito tras la administración intravenosa (4,27 h; tabla 8, pag 107). Esta circunstancia es la esperada dado que este tiempo medio de residencia engloba todos los procesos, tanto los de eliminación como los de absorción.

Al igual que en parámetros anteriores, no existen datos de MRT descritos en cabras para ceftiofur. Los pocos datos sobre este parámetro en la literatura corresponden a otras vías extravasculares de administración, así, en cabras Errecalde y cols. (2006) ofrecen un valor de 2,74 h para la vía intramuscular con la misma sal y dosis que nuestro estudio, y de 1,86 h para la intravenosa, de forma que al igual que en nuestro estudio, el MRT extravascular resulta del orden de 1,5 veces el intravenoso. Para esta misma vía intramuscular, Courtain y cols. (1997) indican un MRT de 4,78 h para la misma sal y dosis que en nuestro estudio frente a un MRT intravenoso de 3,83 h. Probablemente el MAT en estos casos sea algo mayor que el obtenido en nuestro estudio para la vía subcutánea, lo cual es lógico debido a la mejor absorción de la vía intramuscular frente a la subcutánea.

En la tabla 12 (pag 111), se presentan los valores de MAT_{sc1} junto a los de MRT_{sc1} tras la inyección subcutánea; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la tabla 4. El valor del tiempo medio de residencia de absorción se obtiene mediante la diferencia entre el tiempo medio de residencia extravascular y el intravenoso ($MAT_{sc1} = MRT_{sc1} - MRT$). A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en todas las cabras el valor de MAT_{sc1} es inferior al del MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (4,27 h) resulta ser entorno a 2,11 veces superior al MAT_{sc1} (2,02 h). También tras el estudio de estos parámetros parecer extraerse que la absorción, tras la administración subcutánea de ceftiofur, no condiciona su eliminación, como ya señalamos al hablar del tiempo de semivida.

No se han encontrado descritos valores de MAT para ceftiofur en cabras y en otros animales.

5.4.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE CEFTIOFUR EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% EN CABRAS (SC2).

5.4.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (en adelante formulación SC2) a cabras (tabla 13, pag 112), se ha ajustado a un modelo bicompartimentalabierto con absorción de primer orden. En este caso también se han ponderado los datos con respecto a los inversos de los cuadrados de las concentraciones. En todos los casos estudiados, el valor del AIC nos indica que el mejor ajuste es al modelo bicompartimental abierto (trixponencial).

Como en casos anteriores, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (tabla 14, pag 114), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones para todos los animales.

Aunque en la literatura no existen estudios farmacocinéticos realizados con ceftiofur en fórmulas de liberación retardada o controlada como es el caso de la formulación SC1, la aparición de la formulación de acción prolongada "*ácido libre microcristalina*" ha supuesto un considerable aumento de los tiempos de liberación de forma que las pautas para la administración de ceftiofur han pasado desde pautas cada 12 horas a pautas de administración de una o dos dosis. Esta formulación está constituida por una suspensión lista para usar que se administra por vía SC a dosis de 6,6 mg/kg, por lo que en la discusión de la formulación SC2 de nuestro estudio compararemos los datos existentes sobre esta formulación en la literatura científica.

Aunque el número de trabajos es numeroso con esta formulación, apenas existen datos de análisis compartimental, solamente Doré y cols. (2010) ofrece un

análisis compartimental tras la administración de 6,6 mg/kg de la formulación microcristalina obteniendo un modelo monocompartimental.

El modelo bicompartimental abierto tras una dosis subcutánea (figura 12), que viene definido por la ecuación 6, adquiere valores distintos en cada animal (tabla 15, pag 115) y, por tanto, considerando los valores medios de los parámetros farmacocinéticos, la ecuación que mejor describe la evolución de las concentraciones plasmáticas de ceftiofur en formulación SC2 en cabra, tras su administración subcutánea, es la siguiente:

$$C = 988,38 \cdot e^{-0,20t} + 62451 \cdot e^{-0,02t} + 61462,65 \cdot e^{-0,28t} \text{ mg/L} \quad (9)$$

En los gráficos 5 y 6 (pags 113 y 114), se representan las concentraciones individuales para cada animal en escala semilogarítmica, y las medias experimentales. Puede observarse como los niveles de ceftiofur aumentan durante la primera fase de absorción del fármaco, descienden en la fase posterior y, a partir de este momento disminuyen de forma más paulatina, dando lugar a una tercera fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (desde las 24 hasta las 72 horas tras la administración). Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (gráfico 6, pag 114).

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión triexponencial indicada en la ecuación 9, con tres fases exponenciales: absorción, regida por la constante de absorción (K_a), disposición rápida, descrita por la constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución, y la disposición lenta que viene dada por la constante de disposición lenta (λ_2), que rige los procesos de eliminación.

5.4.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental, de ceftiofur en formulación SC2, se muestran en las tablas 15 y 16 (pags 115 y 116). Todos los parámetros van referidos a cada animal y a sus valores medios y estadísticos asociados.

5.4.2.1.- SEMIVIDA.

El tiempo de semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda_1}$) para ceftiofur ha sido de 3,49 h y el de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda_2}$), considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982), ha sido de 41,12 h (tabla 15, pag 115).

El $t_{1/2\lambda_1}$ obtenido resulta ser casi 16,6 y 2,8 veces superior a los obtenidos tras la administración intravenosa y subcutánea sin polímero (tablas 7 y 11, pags 106 y 111). En cuanto al $t_{1/2\lambda_2}$, resulta ser casi 10 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (4,21 h; tabla 3, pag 91), y 8 veces el obtenido tras la administración subcutánea sin polímero (5,10 h; tabla 7, pag 106). Esto es indicativo de que el proceso de absorción, a diferencia de la administración subcutánea sin polímero, es un factor limitante de estos procesos, principalmente del de eliminación.

Si comparamos la semivida obtenida al administrar ceftiofur en formulación SC2, con los valores obtenidos en el caso de ceftiofur mediante la formulación microcristalina en cabras (Doré y cols., 2010) los valores son similares en cabras lactantes (41,5 h) y algo menores en cabra no lactante (36,9 h). En otra especie de pequeños rumiantes como es la oveja, tras la administración SC de la formulación microcristalina se obtuvo un valor superior al de nuestro estudio (52,58 h; Rivera-García y cols., 2014). En nuestro caso, aunque los valores son similares a los de la formulación cristalina, superan con creces a los obtenidos para ceftiofur por vías extravasculares, tanto subcutánea como intramuscular en otros estudios (Courtain y cols., 1997).

5.4.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

El $T_{m\acute{a}x}$ ha resultado ser 4,71 h (tabla 15, pag 115). Si lo comparamos con el $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en la vía subcutánea sin polímero SC1 (1,94 h; tabla 11, pag 111), resulta ser 2,5 veces superior.

Si comparamos el valor obtenido para esta formulación con el valor obtenido para la formulación microcristalina en cabras lactantes (46 h) y no lactantes (26,7 h) por Doré y cols. (2010), observamos que los valores son bastante superiores, aunque hay que tener en cuenta que aunque prácticamente a la misma dosis que en nuestro estudio, la formulación tiene características muy diferentes a las nuestras. Un valor también muy superior se obtuvo en ovejas (23,11 h; Rivera-García y cols., 2014).

La $C_{m\acute{a}x}$, obtenida para ceftiofur en formulación SC2 en cabra, ha sido de 6342,35 $\mu\text{g/L}$ (tabla 12), un 10% superior a la obtenida con la formulación SC1 convencional sin polímero. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la administración de ceftiofur junto con polímero se hizo a una dosis tres veces superior (6 mg/kg, en lugar de 2 mg/kg), así, el valor obtenido resulta casi un tercio inferior a lo esperado. Además, ha de tenerse en cuenta que la formulación es distinta, y que las fases de ingreso pueden ser diferentes (liberación y absorción).

En el estudio realizado en cabras por Doré y cols. (2010), en el que se administró una dosis de 6,6 mg/kg de ceftiofur en formulación microcristalina, la $C_{m\acute{a}x}$ fue de 2250 $\mu\text{g/L}$ en cabras no lactantes y de 1460 $\mu\text{g/L}$ en cabras lactantes. En este caso, el valor es considerablemente inferior al de nuestro estudio.

A priori, teniendo en cuenta el carácter tiempo-dependiente de ceftiofur en cuanto a su eficacia clínica, el desplazamiento del $T_{m\acute{a}x}$ y el aumento de la $C_{m\acute{a}x}$ en la

formulación SC2 van a favorecer el mantenimiento de concentraciones por encima de la MIC durante el tiempo necesario para ejercer su actividad bactericida.

5.4.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN.

Tras la administración de ceftiofur en formulación SC2 a cabras, se ha obtenido un valor aparente de la constante de absorción (k_a) de $0,28 \text{ h}^{-1}$ (tabla 16, pag 116) y de la semivida asociada a la misma ($t_{1/2ka}$) de 2,5 h (tabla 16, pag 116). Si los comparamos con los valores de k_a y de $t_{1/2ka}$ obtenidos tras la administración subcutánea sin polímero; $0,94 \text{ h}^{-1}$ y 0,74 h (tabla 11, pag 111), podemos observar como la absorción es 3,3 veces más lenta cuando se administra el fármaco en formulación SC2. De ahí las propiedades del polímero en sostener la liberación del fármaco y por tanto en alcanzar la circulación sistémica más lentamente.

Como en otros casos, no disponemos de datos de esta formulación en cabras, pero si comparamos con los datos obtenidos en cabras para la formulación microcristalina (Doré y col., 2010), vemos que la k_a fue de $0,21 \text{ h}^{-1}$ en cabras no lactantes, muy parecida a la de nuestro estudio (0,28 h), y de $0,07 \text{ h}^{-1}$ en cabras lactantes. En el caso del $t_{1/2ka}$ el valor obtenido en cabras lactantes fue de 9,71 h y de 3,35 h en cabras no lactantes. En cuanto a valores obtenidos en estudios en otras especies, no existen datos en la bibliografía para ceftiofur en forma microcristalina administrado por esta vía.

5.4.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD.

El valor de AUC, obtenido tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de ceftiofur en formulación SC2, fue de $117125,8 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ (tabla 17, pag 117). El valor es muy similar al obtenido en nuestro estudio para la vía SC1, aunque a una dosis de 2 mg/kg, el valor corregido por el efecto dosis sería de $119652 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, lo que en principio es una buena noticia, ya que indica que apenas hemos perdido dosis a

consecuencia del prolongado tiempo que respecto a la vía convencional el fármaco permanece en el depósito administrado en el tejido subcutáneo.

En cabras, a la dosis de 6,6 mg/kg en la formulación microcristalina (Doré y cols., 2010) en cabras lactantes el valor fue de 159350 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, un 26% superior a nuestro estudio. Sin embargo en ovejas, el valor fue de 206630 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, sensiblemente superior al obtenido en nuestro estudio y al estudio en cabras de Doré y cols. (2010).

Comparada con las vías subcutánea sin polímero e intravenosa, el AUC es 1 y 1,2 veces mayor respectivamente, teniendo en cuenta que se ha administrado una dosis tres veces superior con la formulación SC1 e intravenosa.

La biodisponibilidad obtenida ha sido del $84,43\pm 7,4\%$ (tabla 17, pag 117). Como podemos observar, la asociación del polímero no parece afectar a la biodisponibilidad, ya que el valor obtenido cuando se administró el fármaco por vía subcutánea sin polímero fue del 85,16% (tabla 12, pag 111), reduciéndose un 15% si se compara con la vía intravenosa. Apenas existen datos de biodisponibilidad de ceftiofur vía SC, Errecalde y cols. (2006) ofrecen un dato por vía intramuscular del 97,6%.

5.4.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT_{SC2}) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE ABSORCIÓN (MAT_{SC2}).

El valor medio del MRT_{SC2} alcanza las 25,11 h (tabla 17, pag 117). Este parámetro es 5,9 veces mayor al descrito tras la administración intravenosa (4,27 h; tabla 7, pag 106). Igualmente, es 4 veces superior al obtenido vía subcutánea SC1 sin polímero (6,29 h; tabla 11, pag 111).

En la tabla 13 (pag 112), se presentan los valores de MAT_{SC2} junto a los de MRT_{SC2} tras la inyección subcutánea. El valor del tiempo medio de residencia de absorción se obtiene mediante la diferencia entre el tiempo medio de residencia extravascular y el intravenoso ($\text{MAT}_{\text{SC}} = \text{MRT}_{\text{SC}} - \text{MRT}$). A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en todas las cabras el valor de MAT_{SC} es bastante inferior al del MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (4,27

h) resulta ser entorno a 4,9 veces superior al MAT_{SC2} (20,83 h). También tras el estudio de estos parámetros parecer extraerse que la absorción, tras la administración subcutánea SC2 de ceftiofur, condiciona notablemente la absorción.

No se han encontrado descritos valores de MAT para ceftiofur en cabras y en otros animales.

5.5.- COMPARACIÓN ENTRE ADMINISTRACIONES.

La disposición plasmática de ceftiofur para todas las vías estudiadas, intravenosa y subcutáneas (en solución acuosa (SC1) y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% o formulación SC2) se ajustan mejor a un modelo bicompartimental abierto, existiendo en las vías extravasculares una constante de absorción de primer orden.

Las representaciones gráficas de las concentraciones experimentales (Gráfico 7 y 8, pag 118) sugieren diferencias en el comportamiento del antimicrobiano en cuanto a las fases de ingreso, ya sea administrado por vía subcutánea sin polímero (SC1) o SC2. Esto se refleja en un retraso de la absorción cuando se administra con alguna formulación de liberación controlada, lo cual influye en las fases de disposición, donde parece haber diferencias significativas en las pendientes de las curvas en las fases terminales. Pero para poder cuantificar esta afirmación es necesario comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada caso, entre ellos, la semivida en la fase terminal $t_{1/2\lambda_z}$, el tiempo medio de residencia MRT, la constante de absorción k_a , la concentración máxima alcanzada por vía extravascular con su tiempo asociado C_{max} y T_{max} , el tiempo medio de absorción MAT, el área bajo la curva de niveles plasmáticos AUC y la biodisponibilidad F (%). La existencia de diferencias significativas se ha comprobado mediante un estudio estadístico no paramétrico (H de Kruskal-Wallis), cuyos resultados se muestran en la tabla 19 (pag 120). Una vez realizada dicha prueba, se realiza una segunda prueba en aquellos parámetros que muestren diferencias significativas, utilizando la suma de rangos de Wilcoxon para muestras pareadas cuyos resultados se muestran en la tabla 20 (pag 120).

5.5.1.- SEMIVIDA ($t_{1/2\lambda z}$).

Puede observarse en los valores presentados en la tabla 19 (pag 120) que existen diferencias significativas en los valores de la semivida ($p < 0,05$) entre la vía intravenosa y las vías subcutáneas cuando se administra el fármaco sin polímero (SC1) y con formulación SC2. Tras estos resultados se realiza un segundo análisis mediante la suma de rangos de Wilcoxon (tabla 22, pag 122), que indica que los valores de $t_{1/2\lambda z}$ son similares para formulaciones convencionales entre sí y para las poliméricas entre sí, pero diferentes cuando se comparan entre ellas, tal y como cabría esperar.

La existencia de diferencias entre las semividas medias en la fase terminal para la vía intravenosa y las extravasculares con polímero P407 puede explicarse, posiblemente, porque la fase de absorción en estas últimas influye lo suficiente en la fase de eliminación del fármaco (factor limitante) lo que hace que este se elimine más lentamente (Gráfico 29).

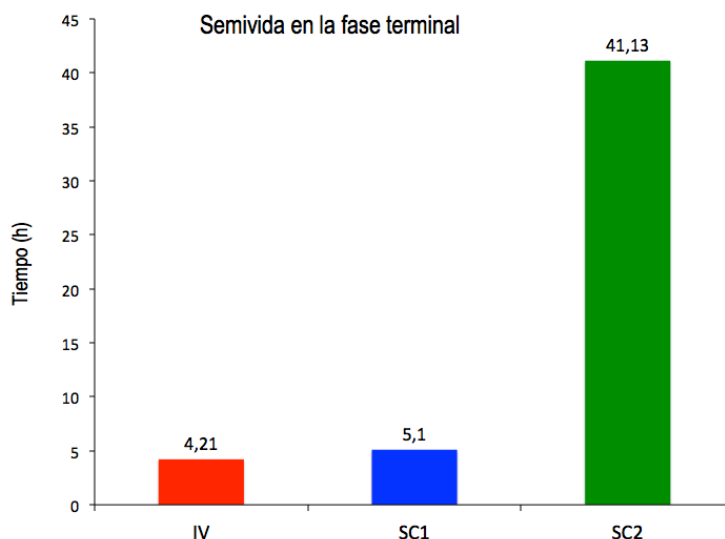


Gráfico 29.-Tiempos de vida media ($t_{1/2\lambda z}$) obtenidos en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.5.2.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

Puede observarse en las tablas 19 y 20 (pag 120) la existencia de diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). En la tabla 21 (pag 121) se observa que el MRT es mayor en las vías extravasculares respecto la vía intravenosa para las administraciones subcutáneas sin y con polímero en la formulaciones SC1 y SC2, respectivamente. Esto indica que la permanencia del fármaco es mayor tras la administración subcutánea y en las dos formulaciones de liberación controlada, y como las concentraciones plasmáticas parecen descender más lentamente en la fase terminal de la curva, tras estas administraciones (gráficos 7 y 8, pag 118), puede ser que la fase responsable del incremento en el MRT sea la fase de ingreso (la absorción) y no la de eliminación (disposición).

A continuación (Gráfico 30), se presentan de forma gráfica los valores de MRT de la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero:

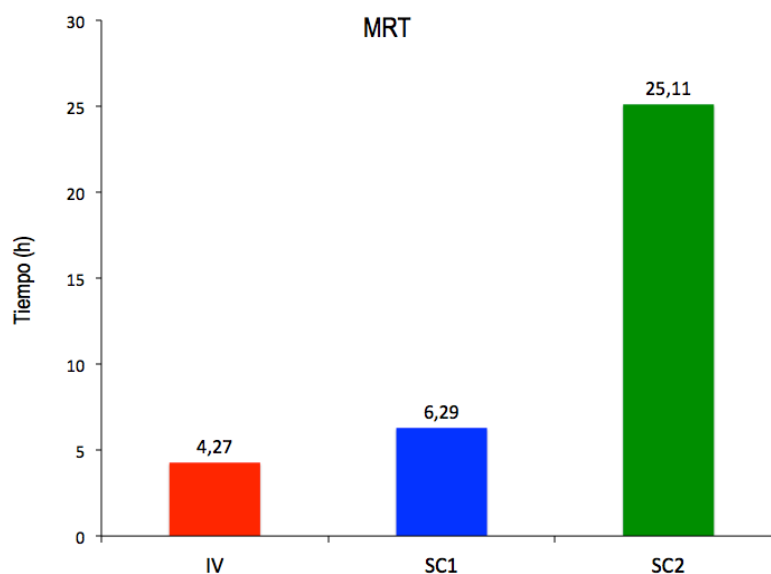


Gráfico 30.- Tiempo medio de residencia (MRT) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV), subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.5.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN (K_a).

Cuando comparamos los resultados obtenidos en la administración subcutánea de ceftiofur sin polímero (SC1) con los obtenidos en la formulación controlada (SC2) (tablas 19 y 20, pags 120), se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$; Gráfico 31, pag 174). Los valores medios de la constante de absorción en las diferentes vías y formas de administración de ceftiofur en cabras se describen en la tabla 18 (pag 119). Podemos observar que la velocidad de ingreso del fármaco (entendida como la suma de las velocidades de eliminación desde la zona de inyección, y de absorción desde dicho punto hasta la sangre (Toutain y cols., 2004b), será menor cuando se administra en formulación SC2, de esta manera, la constante de absorción en la formulación convencional resulta 3,4 veces mayor que la formulación SC2.

La formulación SC1 se formuló con la intención de actuar preferentemente sobre la absorción del fármaco desde el punto de administración subcutáneo retrasándola hasta el punto de alargar su permanencia en el organismo dentro siempre del mantenimiento de unas concentraciones por encima de los valores de CMI de los principales microorganismos diana en nuestro caso. A la luz de los resultados, se ha conseguido disminuir la K_a 3,4 veces, que también tiene un reflejo en la $t_{1/2\ k_a}$ con un valor de 0,74 h para la formulación SC1 y de 2,5 h en la SC2.

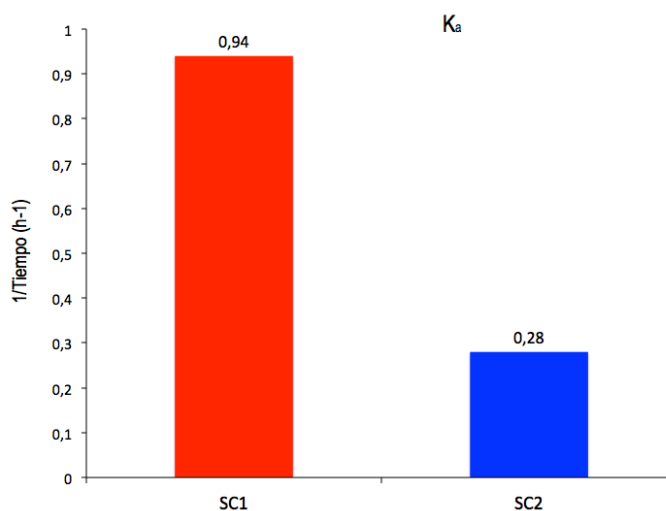


Gráfico 31.- Constante de absorción (k_a) obtenida en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.5.4.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{máx}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{máx}$).

En la tabla 18 (pag 119) se muestran los valores de $T_{máx}$ y $C_{máx}$ de las dos formulaciones subcutáneas. Se puede apreciar (tabla 22, pag 122) que al corregir la dosis en el caso de la $C_{máx}$ de la formulación SC2 para compararla con la SC1 no existen diferencias significativas entre ambas vías ($p > 0,05$). Como se puede observar, se obtienen similares $C_{máx}$ y un mayor $T_{máx}$ cuando se administra el fármaco en formulación SC2.

El mayor valor de $T_{máx}$ medido cuando se administra ceftiofur en la formulación de liberación controlada, indica que el ingreso de ceftiofur debe ser más prolongado, lo que está, a su vez, de acuerdo con los valores obtenidos para la k_a . En los gráficos 32 y 33 (pag 75), se observan las diferencias en el $T_{máx}$ y en la $C_{máx}$, respectivamente, para ceftiofur en cabras, entre las dos vías de administración subcutáneas. Sin embargo, en el gráfico 33 se han incluido, además, los valores de $C_{máx}$ corregidos al mismo nivel de dosis que en la formulación convencional.

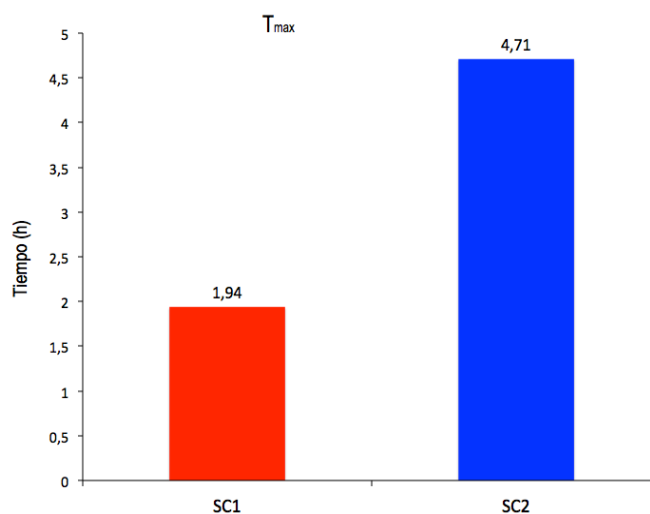


Gráfico 32.- Tiempo máximo ($T_{máx}$) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

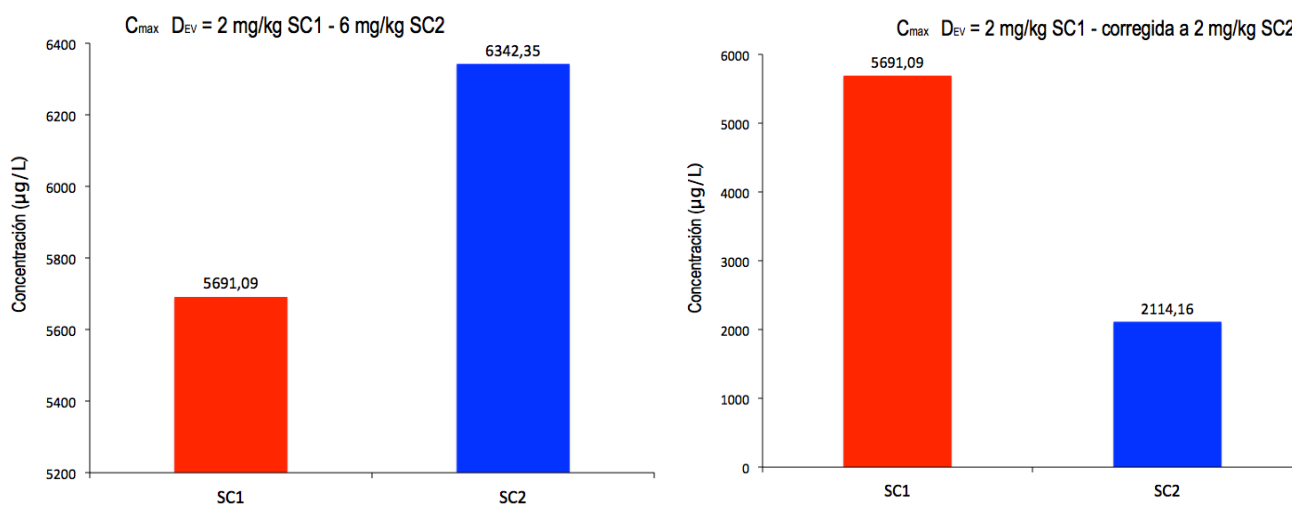


Gráfico 33.- Concentraciones plasmáticas máximas ($C_{máx}$) obtenidas en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. A la derecha, los valores de $C_{máx}$ de ceftiofur tras su administración vía SC2, están corregidos a una dosis de 2 mg/kg*.

En el gráfico 33, izquierda, podemos observar que existen diferencias significativas entre los valores de $C_{máx}$ a dosis de 2 y 6 mg/kg, para las formulaciones SC

y SC2 respectivamente. Corregida esa diferencia de dosis, parte derecha, también se observan diferencias entre la administración convencional y la de liberación controlada.

5.5.5.- TIEMPO MEDIO DE ABSORCIÓN (MAT).

En cuanto al MAT, los valores medios obtenidos tras las administraciones subcutáneas (tabla 18, pag 119) son de 2,02 h para la formulación sin polímero SC1, y de 20,83 h cuando se administra en formulación SC2. Estos valores resultan estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), resultando inferior, en concordancia con lo expuesto anteriormente también para la K_a , el MAT obtenido en la formulación sin polímero, como se ve en el gráfico 34. Por ello la absorción parece ser más lenta tras la administración subcutánea SC2. Como resultado de esta diferencia en el ingreso del fármaco, se obtienen valores de T_{max} superiores y k_a inferiores, pero no se alcanzan valores de $C_{máx}$ significativamente distintos, aunque si más mantenidos entre 1 y 6-8 horas para la formulacion SC2 respecto a la administración sin polímero. Esto parece indicar un cierto equilibrio entre las fases de ingreso (liberación y absorción) y las de disposición (distribución y eliminación) en este intervalo de tiempo.

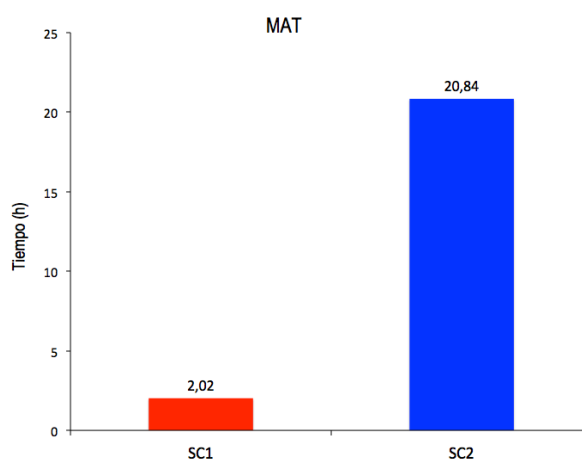


Gráfico 34.- Tiempo medio de absorción (MAT) obtenido en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.5.6.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC).

Las pruebas no paramétricas ponen de manifiesto la no existencia de diferencias significativas en los valores de AUC obtenidos para ceftiofur en cabra tras la vía intravenosa y subcutánea sin polímero, frente a la obtenida con formulación SC2 (tablas 20 y 21, pags 120 y 121). Si bien, los valores de AUC obtenidos con la formulación controlada son mayores que el AUC_{iv}, debemos tener en cuenta que, en parte, se debe a que se han empleado dosis 3 veces mayores para esta formulación de liberación controlada, por lo que al corregir esos AUC_{ev} a una dosis de 2 mg/kg resultan ser similares al AUC_{iv}.

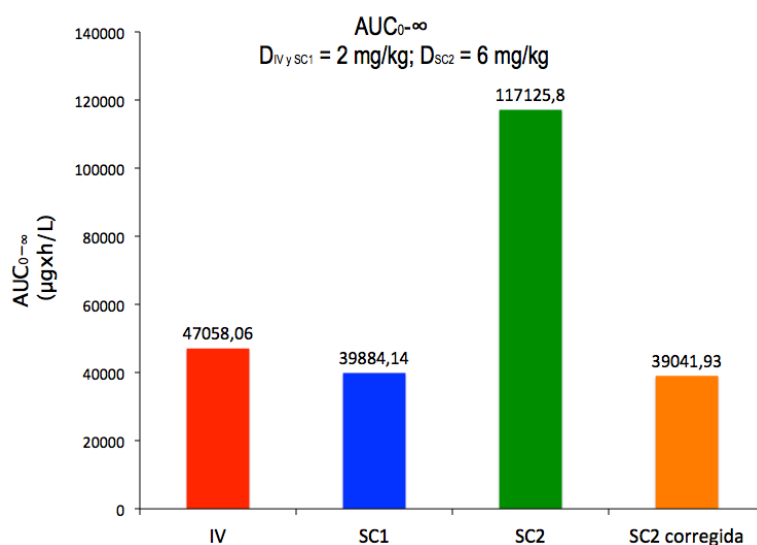


Gráfico 35.- Área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) obtenidos en la cabra tras la administración de ceftiofur vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. En la derecha, el valor de AUC_{0-∞} de ceftiofur tras su administración vía SC2, está corregido a una dosis de 2 mg/kg*.

Al comparar los valores de AUC (Gráfico 35), se puede apreciar que el AUC obtenido tras la administración subcutánea sin polímero es similar, aunque menor a la intravenosa, pero significativamente menor a los valores de AUC obtenidos al

administrarlo en formulación controlada. Cuando se corrigen, en función de la dosis (Gráfico 35), no hay diferencias entre ellos.

Llegados a este punto conviene señalar que la utilización de una dosis tres veces superior en las administraciones con formulaciones poliméricas parece ser adecuada. En efecto, a igualdad de dosis (2 mg/kg) el valor de AUC prácticamente no se modifica (la disposición en suero es muy similar), sin embargo, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ varía considerablemente entre las administraciones extravasculares (gráficos 33 y 35). Por otro lado, cuando se administra la dos formulación polimérica a dosis de 6 mg/kg, el valor de AUC varía considerablemente, pero el valor de $C_{m\acute{a}x}$ prácticamente no se modifica (gráficos 33 y 35, pags 175 y 177).

5.5.7. BIODISPONIBILIDAD (F).

La biodisponibilidad de ceftiofur calculada y corregida en función de la diferencia de dosis, resulta prácticamente igual cuando se administra sin y con polímero tal y como se aprecia en la tabla 18 (pag 119). Estos resultados indican que dicho parámetro no parece afectarse por la utilización del polímero por vía subcutánea en el caso de ceftiofur. Aunque no existen datos para comprobar si esto también ocurre con otras cefalosporinas, en otros grupos terapéuticos en los que sí se han utilizado esta misma formulación polimérica, el resultado final era una disminución de la biodisponibilidad, en función de la formulación SC2 respecto a la subcutánea sin polímero (Titos, 2010; Marín y cols., 2010).

En el gráfico 36 (pag 179), se observa de forma gráfica la no existencia de diferencias en la biodisponibilidad de las dos formulaciones subcutáneas, sin polímero P407 y con polímero P407 + carboximetilcelulosa:

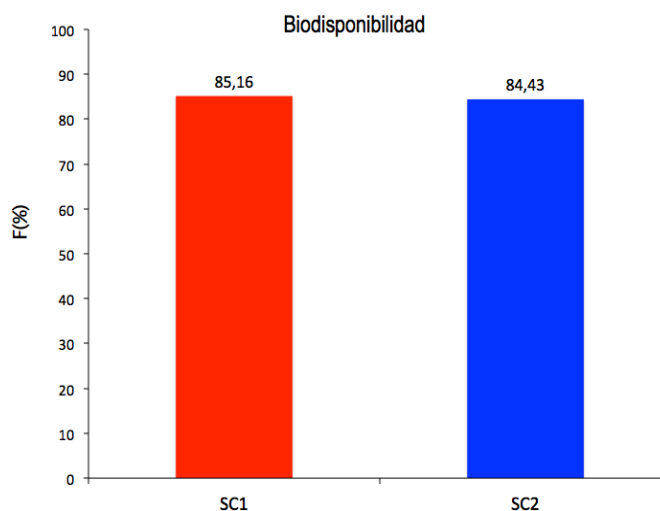


Gráfico 36.- Biodisponibilidad obtenida en la cabra tras la administración de ceftiofur vía subcutánea (SC1) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.6.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LA ABSORCIÓN EXTRAVASCULAR DE CEFTIOFUR MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Se ha utilizado la técnica de deconvolución numérica para evaluar el proceso de absorción del fármaco tras su administración en las formulaciones SC1 y SC2.

La deconvolución se utiliza en farmacocinética para obtener la función *unidad impulso respuesta*, que permite calcular la velocidad de absorción con la que el fármaco accede al compartimento central. Es una herramienta útil para conocer *in vivo* el acceso del fármaco desde la forma medicamentosa, vía extravascular, hasta el organismo.

Para realizar estos estudios, es necesario un conocimiento previo de la función de disposición y eliminación (generalmente una administración intravenosa expresada como $C_{(\delta)}$). Posteriormente, una vez conocida la función de entrada $C_{(t)}$ a estudiar (obtenida mediante administración extravascular), puede expresarse dicha función mediante la ecuación de convolución como: $C_{(t)} = f_{(t)} * C_{(\delta)}$

Donde $C_{(t)}$ y $C_{(\delta)}$ son conocidas, y para conocer la fase de absorción o ingreso $f_{(t)}$ debe realizarse la operación inversa a la convolución, llamada *deconvolución*, tal y como se muestra en la figura 13.

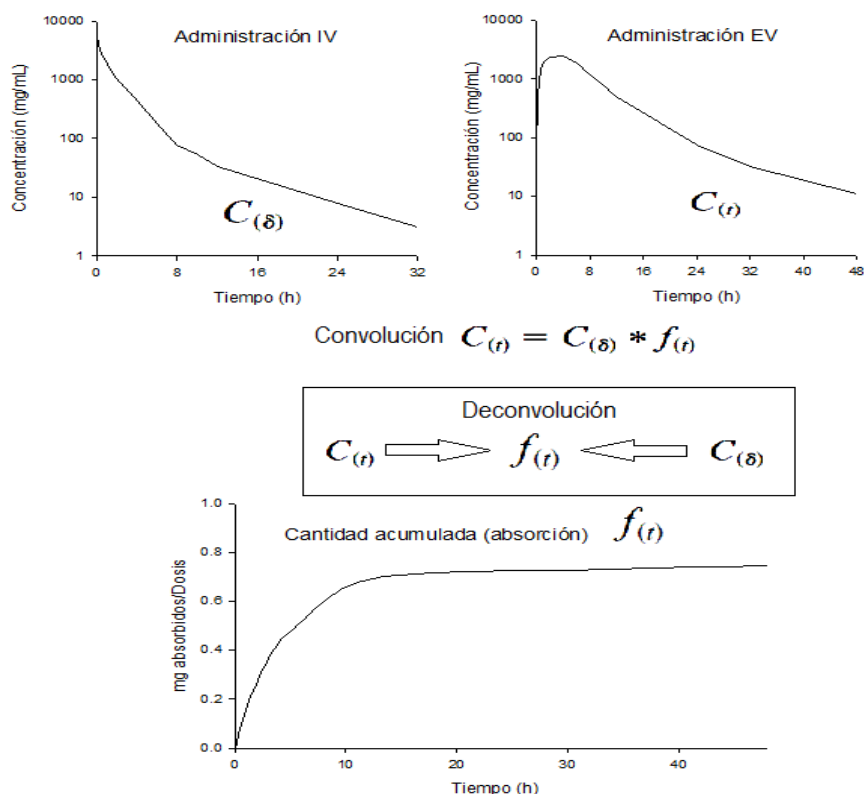


Figura 13.- Proceso de obtención de la fracción de fármaco que accede al compartimento central tras una administración extravascular mediante deconvolución.

Tras aplicar la técnica de deconvolución a las administraciones subcutáneas de ceftiofur a dosis de 2 y 6 mg/kg (SC1 y SC2, respectivamente), se ha obtenido que la formulación convencional a dosis de 2 mg/kg alcanza una velocidad máxima de absorción de $56,64 \pm 24,27$ mg/h a las $0,64 \pm 0,26$ horas, mientras que la formulación polimérica, a dosis de 6 mg/kg, alcanza velocidades máximas de $29,30 \pm 5,10$ mg/h a las $1,92 \pm 0,32$ h. La velocidad de absorción de esta formulación es, aproximadamente, la mitad que la velocidad de la formulación convencional aún cuando se utiliza el triple de dosis.

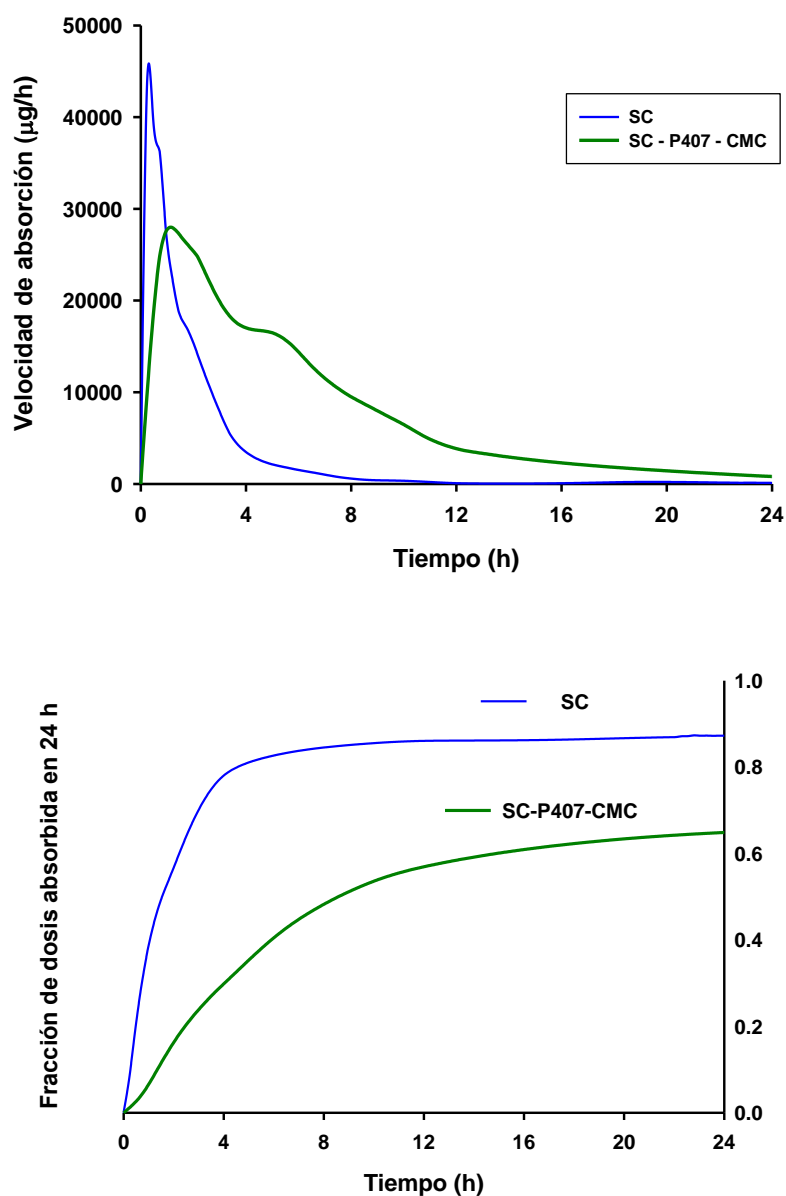


Gráfico 37.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 (arriba). Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 (abajo).

Una inspección visual de las curvas mostradas en el gráfico 37 permite observar la diferencia entre las velocidades de absorción en la formulación SC2 desde 1,00 hasta 8,00 horas, a diferencia de la formulación SC1 donde la caída es más rápida desde las 0,25 – 4,00 horas sin la existencia aparente de otros picos.

La fracción absorbida, normalizada a dosis de 2 mg/kg, presenta diferencias aparentes para las formulación SC2 respecto a la SC1 convencional. En efecto, la curva de la formulación SC1 fue mayor que la curva SC2. Por otra parte, las formulaciones SC1 y SC2 fueron muy similares entre ellas hasta las 8,00 horas, donde la formulación SC1 es ligeramente mayor que la SC2 hasta las 12 horas.

La cantidad total de ceftiofur que accede al compartimento central es de $83,98 \pm 12,44$ mg y $224,74 \pm 23,10$ mg para las formulaciones SC1 y SC2, respectivamente. Sin embargo, cuando se normalizan las dosis a 2 mg/kg, las fracciones absorbidas fueron de $0,87 \pm 0,15$ y $0,75 \pm 0,02$, para las formulaciones SC1 y SC2, respectivamente.

Estos resultados, en general, sugieren un retraso en la absorción para la formulación polimérica SC2 respecto la formulación convencional SC1.

Estas diferencias fueron evaluadas mediante pruebas estadísticas no paramétricas como en los casos anteriores mediante la H de Kruskall-Wallis, previa normalización de los parámetros a dosis de 2 mg/kg en el caso de la formulación SC2. Tras ellas, pudo comprobarse que existen diferencias significativas entre la velocidad máxima, la cantidad y la fracción absorbida entre las dos formulaciones, tal y como se indica en la tabla 31 , y en los gráficos 38, 39 y 40 (pag 183), respectivamente.

Parámetros	Probabilidad (significación)
$V_{m\acute{a}x}$ (mg/h)	0,000
Cantidad absorbida (mg)	0,000
Fracción absorbida	0,000

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas.

TABLA 31.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskall-Wallis) entre los parámetros obtenidos tras deconvolución numérica para ceftiofur tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por subcutánea (SC1), y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

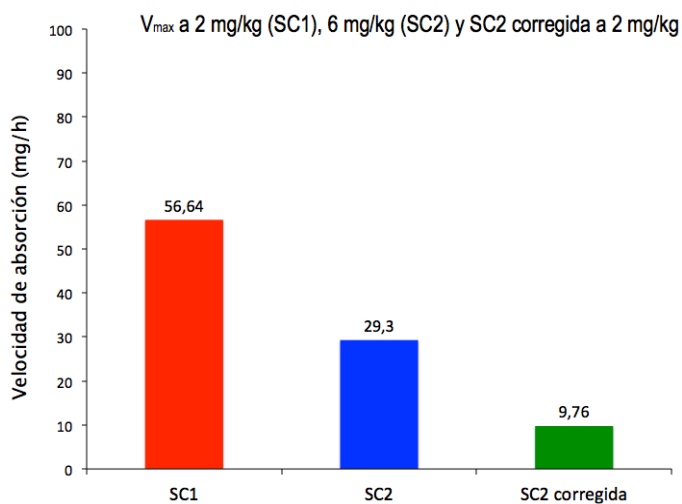


Gráfico 38.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2, y 6 mg/kg y normalizadas a 2 mg/kg.

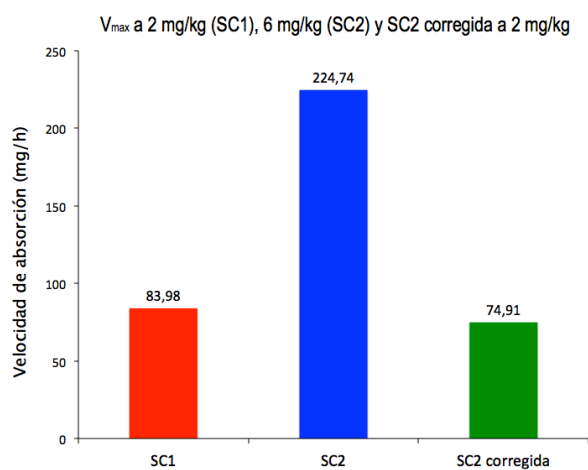


Gráfico 39.- Cantidades absorbidas para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2 y 6 mg/kg y normalizadas a 2 mg/kg (derecha).

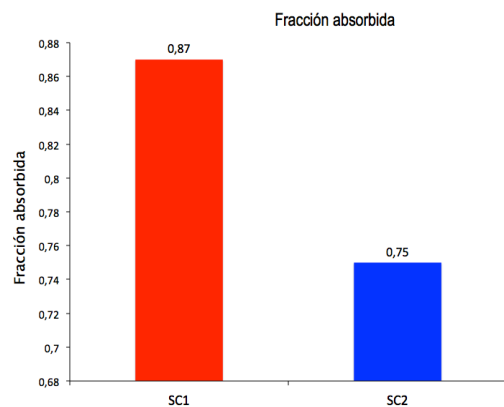


Gráfico 40.- Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC1 y SC2 a las dosis de 2 y 6 mg/kg.

5.7.- INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA.

Ceftiofur pertenece al grupo de antibacterianos cuya actividad es tiempo dependiente, es decir, producen muerte bacteriana en función del tiempo que el antibiótico se encuentra por encima de la CMI (Toutain y cols., 2002; McKellar y cols., 2004). Según Toutain y cols. (2002), el parámetro se calcula por observación directa en una gráfica farmacocinética de concentración *versus* tiempo.

Dicho parámetro PK/PD se puede expresar en horas o bien, como el porcentaje del tiempo entre administraciones en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la CMI. En el caso de las cefalosporinas, se considera adecuado un $T >CMI$ al menos del 50% o superior para garantizar el éxito terapéutico, y óptimo cuando es un 80% del intervalo entre las dosis (Toutain y cols., 2002), y para el efecto bacteriostático cuando permanecen entre el 30-40% de dicho intervalo (Craig, 1998; Drlica, 2003; Drlica y Zhao, 2007).

No es conveniente que el $T >CMI$ sea superior a este último porcentaje, es decir que las concentraciones se mantengan sobre la CMI en forma sostenida en todo el tratamiento, debido a que, para que ceftiofur pueda actuar, las bacterias deben hallarse en fase de crecimiento. Esto significa que la actividad de ceftiofur se manifiesta justamente en el momento en que sus concentraciones comienzan a disminuir por debajo de la CMI, y justifica la necesidad de disponer, entre administraciones, de un período de concentraciones sub-CMI que permitan a las bacterias reiniciar su fase de crecimiento y de esa manera, ser susceptibles a la siguiente dosis y así sucesivamente hasta disminuir la carga bacteriana (Odenholt, 2001; Picco y cols., 2009).

Por otro lado, con respecto a la aparición de resistencias, la hipótesis de la ventana de selección de mutantes, así como sus límites inferior y superior (CMI y CPM respectivamente), han ganado importancia en los últimos años. Recientes estudios hacen hincapié en la importancia de nuevas estrategias de dosificación basadas en la

CPM y no exclusivamente en la CMI para restringir, en la medida de lo posible, la aparición o selección de mutantes resistentes (Drlica, 2003; Drlica y Zhao, 2007; Liu y cols., 2005).

Estudios *in vitro* *ein vivo* para modelos de infección en animales de laboratorio y humanos con *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* han demostrado la importancia de las ratios PK-PD que incluyen la CPM como estrategia de dosificación, ya que se disminuye el enriquecimiento y la amplificación de subpoblaciones no susceptibles o resistentes, mientras que dosificaciones dentro de la ventana de selección de mutantes, es decir, a concentraciones por encima de la CMI y por debajo de la CPM, sí producían dicho enriquecimiento (Blondeu y cols., 2012, Liu y cols., 2005, Ciu y cols., 2006).

El índice de prevención de mutantes (ratio IPM) o CPM/CMI define el rango de concentración en el cual los mutantes resistentes pueden ser enriquecidos y amplificados selectivamente, de manera que, pequeños valores de estas ratios indican, en principio, una mejor capacidad del antibacteriano para prevenir el desarrollo de mutantes utilizando los esquemas de dosificación habituales (Drlica, 2003).

En el presente estudio se ha determinado la sensibilidad a ceftiofur frente a dos cepas de campo de *Mannheimia haemolytica* aisladas de cabras con neumonía.

De estas cepas estudiadas frente a ceftiofur, con un rango de concentraciones entre 0,03 µg/mL - 128 µg/mL, la primera presentó una MIC de 0,031 µg/mL tanto en suero como en medio de cultivo, la segunda cepa presentó una MIC de 0,0625 µg/mL en ambos medios también (tabla 24). En cuanto a la CPM, una cepa presentó una CPM de 0,25 µg/mL, y la segunda de 1,00 µg/mL (tabla 24). Las ratios CPM/CMI fueron de 8 y 16 para las cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas. Estos datos están dentro del rango de valores obtenidos para ceftiofur en otros estudios con cepas aisladas de ganado vacuno (Blondeau y cols. 2012).

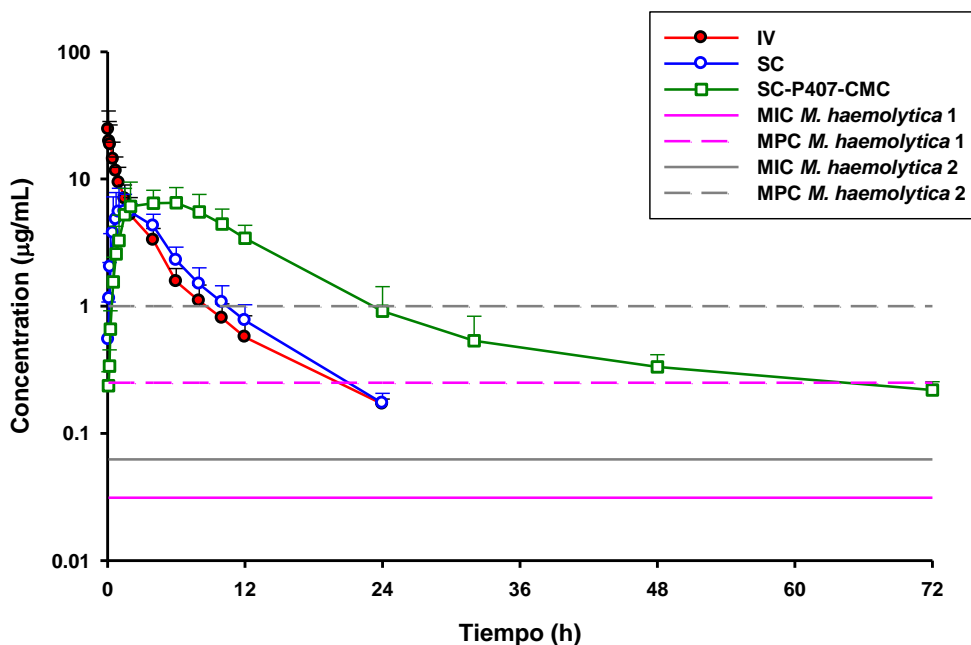
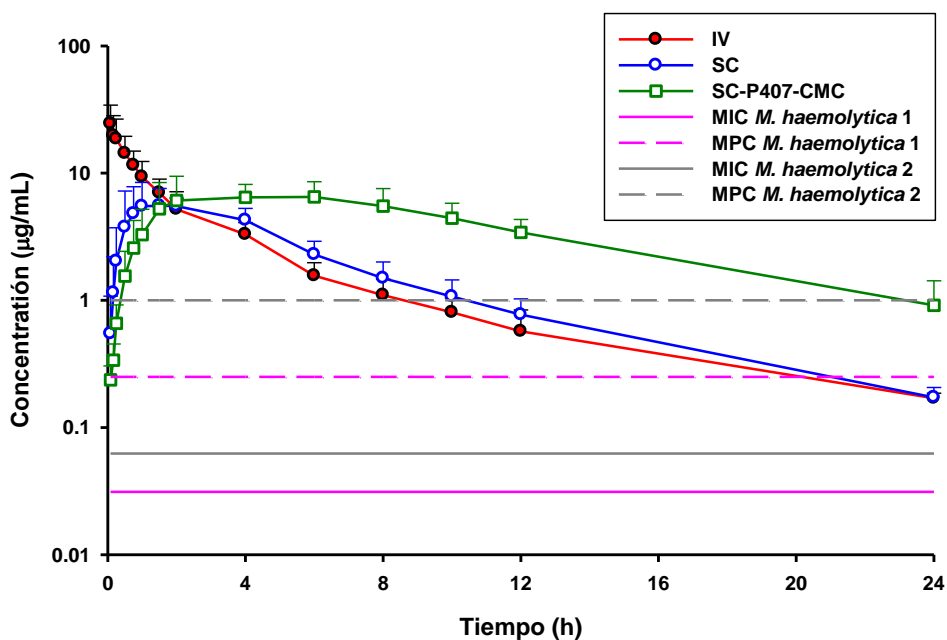


Gráfico 41.-Representación gráfica semilogarítmica de los índices T>CMI y T>CPM para las dos cepas de *M. haemolytica* frente a las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de ceftiofur obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC1), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras durante 24 y 72 horas.

Si observamos el gráfico 41, donde se presentan los niveles plasmáticos alcanzados con cada formulación, podemos identificar que con la formulación convencional SC1, las concentraciones plasmáticas se mantienen por encima de la CMI al menos 24 horas, teniendo en cuenta que la siguiente toma de muestras se produjo a las 32 horas y no se encontraron concentraciones por encima del límite de cuantificación de la técnica. Sin embargo, en el caso de la formulación SC2, las concentraciones por encima de la CMI transcurren durante más de 72 horas, que aplicando el criterio PK-PD correspondiente a este grupo de antibióticos significaría que el 100% del tiempo las concentraciones de antibiótico se han encontrado por encima de las CMI de las cepas estudiadas. Teniendo en cuenta que se recomienda que al menos el 50% del tiempo entre el intervalo de dosificación las concentraciones sean mayores que la CMI, en nuestra formulación de liberación controlada encontramos unos excelentes resultados, ya que ante un régimen de dosis múltiples estaríamos ante un intervalo de dosificación de 72 horas o superior, si tenemos en cuenta que no se deben mantener las concentraciones más del 80% del intervalo de dosificación, que en la práctica quedaría muy cerca de la dosis única.

En las especificaciones indicadas en fichas técnicas de las especialidades farmacéuticas comercializadas en España, el uso de ceftiofur está autorizado para el tratamiento de diferentes infecciones en bovino y cerdo, sin embargo, hasta el momento no está aprobado su uso en cabra. En el caso que nos ocupa, se ha empleado como producto medicamentoso convencional Excenell® solución inyectable para bovino y porcino, y en el caso de la formulación SC2 desarrollada por nuestro grupo a partir de producto puro. En las fichas técnicas se señala como régimen de dosificación para el tratamiento de las infecciones respiratorias producidas entre otros microorganismos por *Mannheimia haemolytica* una administración subcutánea cada 24 horas (1 mg/kg) durante 3-5 días consecutivos. Al analizar los resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos presentados en las tablas y figuras anteriores, y teniendo en cuenta que realizamos un uso excepcional del medicamento de partida, la

pauta indicada podría ser efectiva para la formulación SC1, sin embargo, en el caso de la formulación SC2, el intervalo podría alargarse considerablemente por encima de las 72 horas, puesto que se alcanzan, y se mantienen durante más tiempo, niveles plasmáticos por encima de la CMI y la CPM. Además hay que tener en cuenta que en este tipo de tratamientos el sistema inmunitario del animal juega un papel clave que, por razones prácticas de estos estudios *in vitro*, no se tiene en cuenta aunque *in vivo* es fundamental. En efecto, estos resultados deben tomarse con precaución, ya que se establece como punto de partida alcanzar unas condiciones farmacocinéticas que favorezcan las propiedades farmacodinámicas del antibacteriano. Y estas premisas utilizadas en el estudio integrado farmacocinético-farmacodinámico, pueden no ser aplicables *in vivo* en muchos casos (Lees y Shojaee-Aliabadi 2002a, Toutain y cols., 2004b). Así, los valores de T>CMI como indicadores de eficacia clínica para predecir, establecer dosis y pautas posológicas apropiadas, se han generado en infecciones experimentales con animales de laboratorio, o en pruebas clínicas en el hombre, por lo que pueden ser o no aplicables a infecciones en cabras, o en general, a infecciones en animales (Lees y Aliabadi, 2002a). Algunos autores han sugerido otras pautas pueden ser apropiados en medicina veterinaria para animales inmunocompetentes.

Otro factor a considerar es el medio de cultivo empleado para obtener las CMI y las CPM utilizadas en la integración PK-PD, el cual difiere en muchos aspectos de los fluidos biológicos (plasma y líquido intersticial). Así se encuentran diferencias en la concentración de iones (calcio y magnesio, que pueden inactivar a estos antimicrobianos mediante quelación), 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. Por tanto, no se puede asumir que los valores de las CMI y CPM obtenidos *in vitro* sean idénticos a los obtenidos utilizando los mencionados fluidos biológicos (Aliabadi y Lees, 2001-2002; Drlica y Zhao, 2007).

5.8.- ESTUDIO *IN VITRO* Y *EX VIVO*: CURVAS DE LETALIDAD.

Ceftiofur es un fármaco bactericida en fase de crecimiento que puede clasificarse dentro de los agentes antibacterianos tiempo dependiente. Este tipo de fármacos se caracterizan porque su acción frente al patógeno depende más del tiempo de exposición que de la concentración alcanzada. Cuando estos fármacos alcanzan concentraciones cercanas a la CMI pasan de tener un efecto bacteriostático (Log reducción CFU/mL \approx 0) a tener un efecto bactericida (Log reducción CFU/mL \approx -3 \rightarrow 99,9% de reducción de colonias). En este momento se dice que ha alcanzado la CMB. Sin embargo, a concentraciones mayores a la CMB el efecto bactericida es muy parecido, de manera que, es más importante alcanzar concentraciones ligeramente superiores a la CMI y lo más cercanas a la CMB y mantenerlas durante el mayor tiempo posible. Por esta razón, estos fármacos suelen administrarse a dosis relativamente bajas en posologías múltiples durante varios días (p.e. 1 mg/kg IV cada 6h en 10 días) o utilizando formulaciones de liberación controlada.

Esto es lo contrario de lo que le ocurre a los fármacos concentración dependiente como los aminoglucósidos o las fluoroquinolonas, donde a partir de concentraciones mayores que la CMI, la muerte de bacterias es mayor a mayor concentración de fármaco. En estos casos es preferible una única dosis pero más elevada (p.e. 10 mg/kg q 24h durante 5 días).

Para complementar los resultados obtenidos tras el cálculo de los parámetros $T > CMI$ y $T > CPM$ con las formulaciones de ceftiofur empleadas (IV, SC1 y SC2) sobre las dos cepas de campo de *Mannheimia haemolytica*, se ha evaluado el efecto *ex vivo* que estas bacterias ejercerían sobre un hipotético animal infectado. La ventaja de los métodos *ex vivo* frente a los *in vitro* clásicos es que utilizan medios biológicos que tienen concentraciones de fármaco administrados directamente a los animales. Estos medios de crecimiento son mucho más realistas para simular una infección que los medios de cultivo microbiológicos utilizados en los laboratorios, y además tienen en

cuenta la unión a proteínas plasmáticas, ya que sólo la fracción libre de fármaco es la que ejerce el efecto farmacológico (Lees y Aliabadi, 2002a).

Tras medir las muestras de ceftiofur mediante HPLC y determinar su cinética. Se escogen diferentes muestras de suero obtenidas en varios tiempos de extracción de sangre (y cuya concentración ya es conocida) y se le inoculan 5 μ L de una suspensión de *Mannheimia haemolytica* concentrada. De esta manera cada vial de 500 μ L de suero tiene la concentración de fármaco conocida y una densidad aproximada de unos $1 \cdot 10^7$ CFU/mL. Estas muestras se dejan incubar 24 h y se toman muestras a 0, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Se toman alícuotas, se diluyen y se siembran en placas de agar sangre. Se incuban 24 h y se cuentan las colonias.

Previo al ensayo *ex vivo*, se ha realizado un ensayo *in vitro* que se toma como referencia o patrón. Los valores de unidades formadoras de colonias de cada cepa, y promediadas, tras los ensayos *in vitro* en suero se muestran en las tablas 25, 26 y 27 (pag 136 y 137). Los gráficos 23, 24 y 25 (pags 138 y 139) muestran las curvas de letalidad obtenidas, respectivamente. Si observamos los perfiles de las curvas, podemos ver que la evolución de las mismas conforme aumentan las concentraciones en múltiplos de la CMI se obtiene un perfil propio de los antibióticos tiempo dependientes, en los que al aumentar a partir de 2 y 4 veces la CMI de antibiótico hasta las 24 h, la letalidad va disminuyendo progresivamente, pero mucho más lentamente, dependiendo más del tiempo de exposición que de la concentración alcanzada. Esto refuerza la estrategia del apartado anterior en la que se propone el $T > CMI$ como el parámetro PK-PD más propicio para evaluar la eficacia de ceftiofur en este caso.

Por otro lado, se ha evaluado el efecto *ex vivo* utilizando muestras obtenidas tras la administración de 2 mg/kg de ceftiofur tras su administración intravenosa y 2mg/kg y 6 mg/kg tras la administración de las formulaciones SC1 y SC2,

respectivamente. Las tablas 28, 29 y 30 (pags 139, 140 y 141) y los gráficos 26, 27 y 28 (pags 140, 141 y 142) muestran las curvas de letalidad obtenidas en cada caso.

Podemos ver que las tres curvas presentan también un perfil tiempo dependiente tal y como era de esperar, sin embargo, un análisis detallado de las mismas revela algunas diferencias:

Por un lado, la curva IV y SC1 es muy similar, esto es lógico ya que el perfil de las curvas concentración-tiempo es también muy similar, sobre todo en la fase terminal. Sin embargo, las muestras extraídas a partir de 32h en los animales están por debajo del límite de detección de la técnica, y además, muestran dos posibilidades: o bien son estacionarias o hay crecimiento neto (no son bactericidas).

Sin embargo, al analizar la curva de la formulación controlada SC2, los resultados son diferentes. Todas las concentraciones utilizadas están por encima del LOD la técnica (la dosis es mayor pero más mantenida en el tiempo por su perfil farmacocinético *flip-flop*). Es decir, desde 1h de extracción de sangre hasta 72 h hay un decrecimiento neto de bacterias con esta formulación, a diferencia de las IV y SC donde a estos tiempos no lo hay.

Como consecuencia para las vías IV y SC1 convencionales sería necesario administrar el fármaco cada 12 o 24 h para alcanzar concentraciones por encima del LOD. Sin embargo con la formulación SC2, una dosis de 6mg/kg permite alcanzar estas concentraciones hasta 72h, por lo que una dosis cada 72h podría ser suficiente. Esto sería muy interesante desde el punto de vista práctico ya que incide en una mejora reduciendo el manejo de los animales, el número de dosis a administrar y la eficacia.

6.-CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

- 1- Ceftiofur, a las dosis utilizadas en nuestro estudio en cabras lactantes a dosis de 2 mg/kg vía intravenosa y subcutánea convencional (SC1), y a dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en formulación polimérica de P407 25% + carboximetilcelulosa 2% (SC2), presenta un comportamiento farmacocinético bicompartmental, lo cual está en consonancia con otros estudios realizados con ceftiofur y otras cefalosporinas en cabras y en otras especies.
- 2- La determinación en leche de las concentraciones de ceftiofur por las tres vías de administración revelan una penetración prácticamente nula de ceftiofur, por lo que esta cefalosporina no será adecuada para el tratamiento de afecciones de mama en esta especie por vía sistémica. Sin embargo, el nivel de residuos alcanzado sería muy bajo haciendo de este fármaco una herramienta muy ventajosa para tratar infecciones de otra índole (por ejemplo pulmonares) en cabras lactantes.
- 3- El análisis de los parámetros farmacocinéticos para las tres vías ensayadas revelan una distribución limitada ($V_z = 0,31$ L/kg) pero suficiente para el posible tratamiento de afecciones respiratorias en cabras.
- 4- La permanencia del fármaco en esta especie tras la administración IV, SC1 y SC2 atendiendo a la semivida plasmática obtenida ha sido de 4,21 h (IV), 5,1 h (SC1) y 41,12 h (SC2), destacando la alta permanencia de ceftiofur cuando se administra en la formulación polimérica SC2 y que puede permitir establecer unos regímenes de dosificación lo suficientemente amplios respecto a los de la formulación convencional., lo cual resulta reforzado por los datos de MRT obtenidos (4,27 h IV; 6,29 h SC1; 25,11 h SC2).
- 5- El análisis del proceso de absorción de las dos formulaciones extravasculares analizado mediante la K_a y semivida de absorción, así como desde el análisis de deconvolución muestra un retraso importante en el proceso de absorción de la formulación polimérica respecto a la convencional, prácticamente el doble, lo

cual limita los procesos de eliminación desde le punto de vista de la absorción y condiciona la posibilidad de regímenes posológicos más amplios con la formulación SC2.

- 6- La biodisponibilidad de las dos formulaciones subcutáneas es del 85,16% para la SC1 y del 84,43% para la SC2, valores muy similares que indican que la ralentización en el proceso de absorción de ceftiofur en la formulación polimérica prácticamente no afecta a su biodisponibilidad absoluta.
- 7- Teniendo en cuenta que se recomienda que al menos el 50% del tiempo entre el intervalo de dosificación las concentraciones sean mayores que la MIC, en nuestra formulación de liberación controlada encontramos unos excelentes resultados, ya que ante un régimen de dosis múltiples estaríamos ante un intervalo de dosificación de 72 horas o superior, si tenemos en cuenta que no se deben mantener las concentraciones más del 80% del intervalo de dosificación, que en la práctica quedaría muy cerca de la dosis única.
- 8- El análisis del efecto *in vitro* y *ex vivo* sobre las cepas de *Mannheimia haemolytica* utilizadas en nuestro estudio confirman por un lado el carácter tiempo dependiente de ceftiofur, con unas características especialmente favorables para la formulación polimérica SC2 al alargar el decrecimiento bacteriano hasta las 72 horas.

7.- RESUMEN.

Se ha estudiado el comportamiento farmacocinético de ceftiofur en cabras lactantes tras la administración por las vías intravenosa y subcutánea (SC1) de una dosis de 2 mg/kg, y tras la administración del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% por vía subcutánea (SC2) a la dosis de 6 mg/kg.

La determinación de ceftiofur en plasma y leche se realizó mediante HPLC con detección ultravioleta. Se realizó un ajuste a métodos farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales. Ceftiofur se distribuye según un modelo bicompartimental abierto, tanto por vía intravenosa como por vía subcutánea en los dos casos.

No se obtuvieron concentraciones de ceftiofur en leche por encima del límite de cuantificación de la técnica en ninguna de las tres vías estudiadas. Tras la administración intravenosa, la vida media obtenida para el ceftiofur ($t_{1/2\lambda_z}$) fue de 4,21 h con un tiempo medio de residencia (MRT) de 4,27 h. Los volúmenes de distribución calculados en estado estacionario (V_{ss}) y en función del área bajo la curva (V_z) resultaron ser de 0,18 L/kg y 0,31 L/kg respectivamente, indicando una limitada pero buena distribución orgánica. En cuanto al aclaramiento plasmático (Cl), éste alcanzó un valor de 0,007 L/kg/h.

La formulación convencional por vía subcutánea, así como la formulación de liberación controlada (en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%), nos permitieron registrar los siguientes tiempos de semivida: 5,1 h y 41,13 h, respectivamente, con unos valores de MRT de 6,29 h y 25,11 h, respectivamente.

La biodisponibilidad de ceftiofur en la formulación convencional alcanzó un valor de 85,16%. Valores similares se obtuvieron cuando se administró por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, que fue del 84,43%.

La absorción *in vivo* de ceftiofur desde las formulaciones convencional y de liberación controlada fue evaluada mediante deconvolución numérica y métodos no compartimentales. En el caso de la deconvolución numérica, las velocidades de absorción calculadas para las formulaciones SC1 y SC2 fueron de $56,64 \pm 24,27$ mg/h a

0,64 ± 0,26 h y 29,30 ± 5,10 mg/h a 1,92 ± 0,32 h, respectivamente. Mediante la aproximación no compartimental sólo se obtuvieron valores de MAT superiores al MRT_{IV} (4,27 h) para la formulación SC2 (20,84 h). Estos resultados indican que las diferencias en las velocidades de eliminación y en los tiempos medios de residencia pueden ser debidas a diferencias en los procesos de absorción.

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), la concentración preventiva de mutantes (MPC), el índice de prevención de mutantes (MPI) y la ventana de selección de mutantes para ceftiofur frente a cepas de *Mannheimia haemolytica* a fin de determinar los índices farmacocinético-farmacodinámicos óptimos. También se realizó un análisis del efecto *in vitro* y *ex vivo* sobre las mismas cepas. El análisis de los resultados muestra que la formulación de liberación controlada SC2 ante un régimen de dosis múltiples mostraría eficacia durante al menos 72 horas. Esto queda reforzado al analizar el efecto *in vitro* y *ex vivo* sobre las cepas de *Mannheimia haemolytica* que confirma por un lado el carácter tiempo dependiente de ceftiofur, con unas características especialmente favorables para la formulación polimérica SC2 al alargar el decrecimiento bacteriano hasta las 72 horas.

8.- SUMMARY.

The pharmacokinetics of ceftiofur was studied following intravenous and subcutaneous (SC1) administration of single doses of 2 mg/kg to healthy goats, and as a long-acting poloxamer 407 gel formulation and poloxamer 407 + carboxymethylcellulose (SC2) of 6 mg/kg.

Plasma concentrations were determined by HPLC assay with ultraviolet detection. Data were fitted to compartmental and non compartmental pharmacokinetic methods. The ceftiofur plasma concentration versus time data after intravenous and extravascular administrations could best be described by a two compartment open model.

The ceftiofur terminal half-life ($t_{1/2\lambda_z}$) was 4,21 h after intravenous administration, with a mean residence time (MRT) of 4,27 h. The apparent volumes of distribution calculated at steady-state (V_{ss}) and by the area method (V_z) were 0,18 and 0,31 L/kg, respectively, indicating a wide body distribution. Total body clearance was 0,007 L/kg/h.

After extravascular administrations, terminal half-lives were 5,10 and 41,12 h for ceftiofur administration subcutaneously for conventional formulation and for long-acting poloxamer 407 + carboxymethylcellulose, respectively. MRT values obtained were 6,29 and 25,11 h respectively.

Absolute bioavailability was 85,16% after ceftiofur subcutaneous administration of conventional formulation. Similar value was obtained, 84,43 %, after ceftiofur administration subcutaneously with long-acting poloxamer 407 + carboxymethylcellulose.

The *in vivo* ceftiofur absorption rate from conventional and poloxamer formulation was estimated by non-compartmental method and numeric deconvolution. In the case of numeric deconvolution, the calculated absorption rates and the cumulative absorption in terms of fraction input SC1 and SC2 formulations were $56,64 \pm 24,27$ mg/h at $0,64 \pm 0,26$ h and $29,30 \pm 5,10$ mg/h at $1,92 \pm 0,32$ h, respectively. From non-compartmental approach, only the MAT values for SC2 (20,84 h) was higher than MRT_{IV} (4,27 h). These results show that the differences on

elimination rate constants and mean residence times between conventional SC1 and long-acting SC2 formulations must be due to differences on the absorption process.

Minimal inhibitory concentrations (MIC) assays of ceftiofur against different strains of *Mannheimia haemolytica* were performed in order to compute pharmacodynamic surrogate markers. *In vitro* and *ex vivo* analysis were performed over the same strains. From these data, it is concluded that in a multiple dose regimen of ceftiofur for the SC2 formulation, efficacy would prolonge longer than 72 h. This conclusion has been inforced by the *in vitro* and *ex vivo* analysis showing the time-dependent profile of ceftiofur, and also showing a growth decay of bacteria until at least 72 h.

9.- BIBLIOGRAFÍA.

- ABO EL-SOUD K, EL-BANNA HA, HANAFY MS, GOUDAH A. (2000). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of cefuroxime sodium in goats. *Res Vet Sci.* 69(3): 219-224.
- ABRAHAM EP, NEWTON GGF. (1961). The structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 79(2): 377–393.
- ALDRIDGE KE. (2002). Comparison of the post-antibiotic effect (PAE) induced by ceftizoxime, ceftriaxone, ceftiofur, ampicillin-sulbactam, and ticarcillin-clavulanate against selected isolates of *Bacteroides fragilis* and *B. thetaiotaomicron*. *Anaerobe.* 8(6): 295-259.
- ALIABADI FS, LEES P. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration. *Am. J. Vet. Res.* 62 (12): 1979-1989.
- ALIABADI FS, LEES P. (2002). Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics.* 25, 161–174.
- AL-KHERAIJE KA. (2013). Studies on the Antibacterial Activity of Ceftiofur Sodium *In Vitro* and Birds. *Open Journal of Veterinary Medicine.* 3, 16-21.
- ALLAN J, MACHADO R. (1998). Combinaciones de antimicrobianos. *Acta medica.* 8(1): 101-104.
- ALLAN MJ, THOMAS E. (2003). Pharmacokinetics of ceftiofur after parenteral administration of an aqueous solution in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 26 (Suppl. 1): 82–307
- AMBLER RP. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036): 321-331.
- AMBROS L, KREIL V, TARRAGONA L, MONFRINOTTI A, HALLU R, REBUELTO M. (2010). Comparative pharmacokinetics of intravenous cephalexin in pregnant, lactating, and nonpregnant, nonlactating goats. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 34: 397–402.
- ARRIOJA-DECHERT A. (2002). Compendium of Veterinary Products, CD edition. Port Huron, MI: North American Compendiums, Inc.
- ANDES D, CRAIG WA. (2002). Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents* 19: 261-268.
- ASLAM MA, AHMED Z, AZIM R. (2004). Microbiology and drug sensitivity patterns of chronic suppurative otitis media. *J Coll Physicians Surg Pak.* 14(8): 459-461
- ATEF M, RAMADAN A, AFIFI NA, YOUSSEF SA. (1990). Pharmacokinetic profile of cefotaxime in goats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 97(8): 32-37.

- ATKINSON AJ, KUSHNER W. (1979). Clinical Pharmacokinetics. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19: 105-127.
- AUSINA RUIZ V, MORENO GUILLÉN S. (2006). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana; Madrid.
- BADE D, PORTIS E, KEANE C, HALLBERG J, BRYSON L, SWEENEY M, BONER P. (2009). *In vitro* susceptibility of ceftiofur against *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* and subsp *equi* isolated from horses with lower respiratory disease in Europe since 2002. *Vet Ther.* 10(4):E1-10.
- BAHK JY, HYUN JS, LEE JY, KIM J, CHO YH, LEE JH, PARK, JS, KIM MO. (2000). Concentration of ofloxacin in canine prostate tissue and prostate fluid after intraprostatic injection of biodegradable sustained-releasing microspheres containing ofloxacin. *J Urol.* 163(5): 1560-1564.
- BALDO BA. (1999). Penicillins and cephalosporins as allergens: structural aspects of recognition and cross-reactions. *Clin Exp Allergy.* 29: 744-749.
- BARR BS, WALDRIDGE BM, MORRESEY PR, REED SM, CLARK C, BELGRAVE R, DONECKER JM, WEIGEL DJ. (2013). Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet. J.* 45, 154-158.
- BARSANTI JA, CHATFIELD RC, SHOTTS EB, CROWELL WA, HARDIN JA. (1985). Efficacy of cefadroxil in experimental canine cystitis. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 21: 89-93.
- BARZA M, LYNCH E, BAUM JL. (1993). Pharmacokinetics of newer cephalosporins after subconjunctival and intravitreal injection in rabbits. *Arch Ophthalmol.* 111(1): 121-125.
- BECONI-BARKER MG, HORNISH RE, VIDMAR TJ, DAME KJ Y BROWN SA. (1996). Ceftiofur hydrochloride: plasma and tissue distribution in swine following intramuscular administration at various doses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 19 (3): 192–199.
- BELTRAN C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. *Rev Chil Infect.;* 21 (1): S39-S44.
- BENSON KG, TELL LA, YOUNG LA, WETZLICH S, CRAIGMILL AL. (2003). Pharmacokinetics of ceftiofur sodium after intramuscular or subcutaneous administration in green iguanas (*Iguana iguana*). *Am J Vet Res.* 64(10):1278-1282.
- BERGOLD, A. M. (2007). Development of a microbiological assay to determine the potency of ceftiofur sodium powder. *J AOAC Int.* 90 (6): 1724 - 1728.
- BISHOP R, WEINER J. (1992). Coordinate regulation of murein peptidase activity and AmpC β -lactamase synthesis in *E. coli*. *FEBS LEFT.* 304(2-3): 103-108.

BLANCA M, VEGA JM, GARCIA J, MIRANDA A, CARMONA MJ y JUÁREZ C. (1994). New aspects of allergic reactions to beta-lactams-crossreactions and unique specificities. *Clin. Exp. Allergy* 24: 407-415.

BLOCK CV, WANNER M, HEINRITZI K. (2005) Pharmacokinetics of cephalosporine cefquinome in sows at different reproduction-phase. *Tierärztliche Umschau*, 60: 137–145.

BLONDEAU JM, BORSOS S, BLONDEAU LD. BLONDEAU BJJ, HESJE CE. 2012. Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary Microbiology*. 160(1-2): 85-90.

BOHNEN JM, SOLOMKIN JS, DELLINGER EP, BJORNSON HS, PAGE CP. (1992). Guidelines for clinical care: anti-infective agents for intra-abdominal infection. A Surgical Infection Society policy statement. *Arch Surg*. 127(1): 83-89.

BROGDEN RN, CARMINE A, HEEL RC, MORLEY PA, SPEIGHT TM, AVERY GS. (1981). Cefoperazone: A review of its *in vitro* antimicrobial activity, pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. 22(6): 423-460.

BOWMAN WC, RAND M. (1980). Textbook of Pharmacology. Blackwell Science Ltd; Edición: 2nd Revised. Oxford. UK.

BROWN DF, REYNOLDS PE. (1980). Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*. 122(2): 275–278.

BROWN, GR. (1993). Cephalosporin-probencid drug interactions. *Clin Pharmacokinetic* 24(4): 289-300.

BROWN MP, GRONWALL RR, HOUSTON AE. (1986). Pharmacokinetics and body fluid and endometrial concentrations of ceftiofur in mares. *Am J Vet Res*. 47(8): 1734-1738.

BROWN MP, GRONWALL R, GOSSMAN TB, HOUSTON AE. (1987). Pharmacokinetics and serum concentrations of cephalosporin in neonatal foals. *Am J Vet Res*. 48(5): 805-806.

BROWN SA, ARNOLD TS, HAMLOW PJ, SPEEDY AK, DELEEUW NL, HUBBARD VL, CALLAHAN JK, FOLZ SD, JANOSE RL, FLOOK TF. (1995). Plasma and urine disposition and dose proportionality of ceftiofur and metabolites in dogs after a subcutaneous administration of ceftiofur sodium. *J Vet Pharmacol Ther*. 18(5): 363–369.

BROWN SA, CHESTER S T, ROBB EJ. (1996). Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. *J Vet Pharmacol Ther*. 19 (1): 32 - 38.

BROWN SA, HANSON BJ, MIGNOT A, MILLÉRIOUX L, HAMLOW PJ, HUBBARD VL, CALLAHAN JK, KAUSCHE FM. (1999). Comparison of plasma pharmacokinetics and bioavailability of ceftiofur sodium and ceftiofur hydrochloride in pigs after a single intramuscular injection. *J Vet Pharmacol Ther*. 22(1):35-40.

- BROWN SA, BRYSON WL, HALLBERG J, LUCAS M, NAPPIER J, ROBINSON JA. (2006). EXCEDE® Sterile Suspension: Pharmacology, microbial susceptibility, and efficacy in lactating dairy cows. Pfizer Animal Health. Technical bulletin.
- BURTON PJ, THORNSBERRY C, CHEUNG YEE Y, WATTS JL, YANCEY RJ Jr. (1996). Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest.* 8(4):464-468.
- BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 39(6): 1211-1233.
- CAMPAGNA JD, BOND MC, SCHABELMAN E, HAYES BD. (2012). The use of cephalosporins in penicillin-allergic patients: a literature review. *J Emerg Med.* 42(5): 612-620.
- CAMPBELL BG, ROSIN E. (1998). Effect of food on absorption of cefadroxil and cephalexin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 21(5): 418-420.
- CANEPARI P, LLEO MM, CORNAGLIA G, FONTANA R, SATTA G. (1986). In *Streptococcus faecium* penicillin-binding protein 5 alone is sufficient for growth at sub-maximal but not at maximal rate. *J. Gen. Microbiol.* 132: 625–631.
- CÁRCELES CM, SERRANO JM, MARÍN P, ESCUDERO E, FERNÁNDEZ-VARÓN E. (2006). Pharmacokinetics of moxifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and a long-acting poloxamer 407 gel formulation administration. *J. Vet. Med.* 53: 300-304.
- CARLBERG H, ALESTIG K, NORD CE, TROLLFORS B. (1982). Intestinal side effects of cefoperazone. *J Antimicrob Chemother.* 10(6): 483-7.
- CARLI S, ANFOSSI P, VILLA R, CASTELLANI G, MENGOZZI G, MONTESISSA C. (1999). Absorption kinetics and bioavailability of cephalexin in the dog after oral and intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther.* 22(5): 308-313.
- CERVANTES CC, BROWN MP, GRONWALL R, MERRITT K (1993). Pharmacokinetics and concentrations of ceftiofur sodium in body fluids and endometrium after repeated intramuscular injections in mares. *Am J Vet Res* 54(4): 573–5.
- CESTER CC, SCHNEIDER M, TOUTAIN PL. (1996). Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: enrofloxacin versus marbofloxacin. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 147: 703- 716.
- CHAMBERS HF. (1999). Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J infect Dis.* 179 (2): 353-359.
- CHAMBERS HF. (2003). Solving staphylococcal resistance to beta-lactams. *Trends Microbiol.* 11(4): 145-148.

- CHATFIELD RC, GINGERICH DA, ROURKE JE, STROM PW. (1984). Cefradoxil: a new orally effective cephalosporin antibiotic. *Vet Med.* 79:339-346.
- CHIKWAVA KR, SAVELL VH, BOYD TK. (2006). Fatal cephalosporin-induced acute hypersensitivity myocarditis. *Pediatr Cardiol.* 27(6): 777-780.
- CHUNG HS, JUNG WC, KIM DH, LIM JJ, SON HY, KIM S, LEE HJ. (2007). Ceftiofur distribution in plasma and tissues following subcutaneously administration in ducks. *J Vet Med Sci.* 69(10):1081-5.
- CUI J, LIU Y, WANG R, TONG W, DRLICA K, ZHAO X. (2006). The mutant selection window demonstrated in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 194: 1601–1608.
- CLARKE CR, BROWN SA, STREETER RN, CLARKE JM, HAMLOW PJ, CALLAHAN JK, HUBBARD VL, SPEEDY AK, BURROWS GE. (1996). Penetration of parenterally administered ceftiofur into sterile vs. *Pasteurella haemolytica*-infected tissue chambers in cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 19(5): 376–81.
- COLLARD WT, COX SR, LESMAN SP, GROVER GS, BOUCHER JF, HALLBERG JW, ROBINSON JA, BROWN SA. (2011). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline-free acid sterile suspension in the equine. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 34: 476–481.
- CORDIES L, MACHADO LA, HAMILTON ML. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica.* 8(1): 13-27.
- COURTIN F, CRAIGMILL AL, WETZLICH SE, GUSTAFSON CR, ARNDT TS. (1997). Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to dairy goats. *J Vet Pharmacol Ther.* 20(5):368-373.
- CRAIG WA. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases.* 26: 1–10.
- CRAIGMILL AL, BROWN SA, WETZLICH SE, GUSTAFSON CR, ARNDT TS. (1997). Pharmacokinetics of ceftiofur and metabolites after single intravenous and intramuscular administration and multiple intramuscular administrations of ceftiofur sodium to sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 20(2):139-144.
- DALY RC, FITZGERALD RH, WASHINGTON JA. (1982). Penetration of cefazolin into normal and osteomyelitic canine cortical bone. *Antimicrob Agents Chemother.* 22(3): 461–9.
- DÁMASO D. (1990). Antibacterianos. 1ª Edición. Ed. Marketing Pharm, S.A. Madrid.
- DAVIS BD, DULBECCO R, EISEN HN, GINSBERG HS, WOOD BW. (1968). Principles of Microbiology and Immunology. Harper & Row Ed. New York.

DAVIS JL, SALMON JH, PAPICH MG. (2005). Pharmacokinetics and tissue fluid distribution of cephalexin in the horse after oral and i.v. administration. *J Vet Pharmacol Ther.* 28(5): 425-431.

DAY, DEANNE NICOLE, "Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Streptococcus suis changes the pharmacokinetics of ceftiofur hydrochloride in swine" (2014). Graduate Theses and Dissertations. Paper 13725. UniversityFollow. Degree Type. Thesis. Iowa State.

DOMÉNECH BERROZPE J, MARTÍNEZ LANA O J, PLÁ DELFINA JM. (1997). Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen 1. Ed. Síntesis S.A. Madrid.

DONG H, ZHANG J, REN L, LIU Q, ZHU S. (2013). Unexpected death due to cefuroxime-induced disulfiram-like reaction. *Indian J Pharmacol.* 45(4): 399-400.

DORÉ E, ANGELOS JA, ROWE JD, CARLSON JL, WETZLICH SE, KIEU HT, TELL LA. (2010). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline free acid after single subcutaneous administration in lactating and nonlactating domestic goats (*Capra aegagrus hircus*). *J Vet Pharmacol Ther.* 34 (1): 25- 30.

DOUNIS E, KORAKIS T, ANASTASIADIS A, KANELAKOPOULOU K, ANDREOPOULOS A, GIAMARELLOU H. (1996). Sustained release of fleroxacin *in vitro* from lactic acid polymer. *Bull Hosp It Dis.* 55(1): 16-19.

DREW ML, JOHNSON L, PUGH D, NAVARRE CB, TAYLOR IT, CRAIGMILL AL. (2004a). Pharmacokinetics of ceftiofur in llamas and alpacas. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27: 13–20.

DREW ML, WALDRUP K, KREEGER T, CRAIGMILL AL, WETZLICH SE, MACKINTOSH C. (2004b). Pharmacokinetics of ceftiofur in red deer (*Cervus elaphus*). *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27: 7–11.

DRLICA K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. (2003). *J Antimicrob Chemother.* 52: 11–17.

DRLICA K, ZHAO X. (2007). Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis.* 44: 681–688.

DUEGER EL, GEORGE LW, ANGELOS JA, TANKERSLEY NS, LUIZ KM, MEYER JA, PORTIS ES, LUCAS MJ. (2004). Efficacy of a long-acting formulation of ceftiofur crystalline-free acid for the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res.* 65(9): 1185-1188.

DUFFEE NE, CHRISTENSEN JM, CRAIG AM. (1989). The pharmacokinetics of cefadroxil in the foal. *J Vet Pharmacol Ther.* 12(3): 322-326.

EL-SAYED MGA, EL-KOMY AAA, EL BARAWY AM, IBRAHIM DMA. (2015). Pharmacokinetics and Tissue Residues of Ceftiofur in Normal and *Escherichia Coli* Infected Chickens. *J Phys Pharm Adv.* 5(3): 574-582.

EL-SOUD KA, EL-BANNA HA, HANAFY MS, GOUDAH A. (2000). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of cefuroxime sodium in goats. *Res Vet Sci.* 69(3): 219-224.

EMEA/CVMP/SAGAM/81730/2006-Rev.1. Revised reflection paper on the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in food producing animals in the european union: development of resistance and impact on human and animal health. London, 16 March 2009.

EMEA. Ceftiofur. Summary report 1.

EMEA/MRL/498/98. Ceftiofur. Summary report 2.

EMEA/MRL/835/02. Ceftiofur. Summary report 3.

EMEA/CVMP/80785/2006. Ceftiofur. Summary report 4.

ENTENZA JM, HOHL P, HEINZE-KRAUSS I, GLAUSER MP, MOREILLON P. (2002). BAL9141, a Novel extended-spectrum cephalosporin active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in treatment of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1): 171-177.

ERRECALDE CA, PRIETO G, LÜDERS CF, GARCÍA OVANDO H. (2006). Farmacocinética y biodisponibilidad de ceftiofur sódico en caprinos. *Rev Col Cienc Pec.* 19(3):306-311.

ERSKINE RJ, BARTLETT PC, JOHNSON GL, HALBERT LW. (1996). Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 208 (2): 258 - 260.

ERSKINE RJ, WILSON RC, TYLER JW, MCCLURE KA, NELSON RS, SPEARS HJ. (1995). Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental *Escherichia coli* - induced mastitis. *Am J Vet Res.* 56 (4): 481 - 485.

ESCUADERO E, MARÍN P, CÁRCELES CM, RAMIREZ MJ, FERNÁNDEZ-VARÓN E. (2011). Pharmacokinetic and milk penetration of a difloxacin long-acting poloxamer gel formulation with carboxy-methylcellulose in lactating goats. *The Veterinary Journal,* 188 (1): 92-95.

FASS RJ, PERKINS RL, SASLOW S. (1970). Cephalixin – a new oral cephalosporin: clinical evaluation in sixty-three patients. *Am J Med Sci.* 259(3): 187-200.

FECTEAU ME, HOUSE JK, KOTARSKI SF, TANDERSLEY NF, ONTIVEROS MM, ALCANTAR CR, SMITH BP. (2003). Efficacy of ceftiofur for treatment of experimental salmonellosis in neonatal calves. *Am J Vet Res.* 64(7): 918–925.

FERNÁNDEZ, R. (2013). Estudio farmacocinético de Formulaciones Poliméricas de Liberación Controlada para Marbofloxacino en Caprino. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

FILE TM, WILCOX MH, STEIN GE. (2012). Summary of ceftaroline fosamil clinical trial studies and clinical safety. *Clin Infect Dis*. 55(3): S173-S180.

FICHA TÉCNICA ACTIONIS 50 mg/ml, suspensión for injection for pigs and cattle. ® (AEMPS).

FICHA TÉCNICA CEFENIL® (AEMPS).

FICHA TÉCNICA COBACTAN 2,5% p/v suspensión inyectable®. (AEMPS).

FICHA TÉCNICA NAXCEL 100mg/ml suspensión inyectable para cerdos®. (AEMPS).

FICHA TÉCNICA NAXCEL 200mg/ml suspensión inyectable para bovino®. (AEMPS).

FLÓREZ, J. 2014. Farmacología humana. 6ªed. Flórez J. dir. Elsevier. ISBN: 9788445823163

FONATANA R, GROSSATO A, ROSSI L, CHEN YR, SATTÀ, G. (1985). Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 28(5): 678-683.

FONTANA R, ALDEGHERI M, LIGOZZI M, LOPEZ H, SUCARI A, SATTÀ G. (1994). Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 38: 1980–1983.

FRANK LA, KUNKLE GA. (1993). Comparison of the efficacy of cefadroxil and generic and proprietary cephalexin in the treatment of pyoderma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 203(4): 530-533.

FRERE JM, GALLEN M, BUSH K, DIDEBERG O. (2005). Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? *J Antimicrob Chemother*. 55(6): 1051-1053.

FRIEDLAND, IR y MCCracken, GH. (1994). Management of infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med*. 331(6): 377-382.

FULTZ LE. (2014). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline free acid in adult horses after weekly intramuscular and subcutaneous administration and disposition of ceftiofur sodium after nebulization and intramuscular administration to weanling foals. Tesis.

FULZELE SV, SATTURWAR PM, DORLE AK. (2007). Novel biopolymers as implant matrix for the delivery of ciprofloxacin: biocompatibility, degradation, and *in vitro* antibiotic release. *J Pharm Sci*. 96(1): 132-144.

FUNG-TOMC JC, CLARK J, MINASSIAN B, PUCCI M, TSAI YH, GRADELSKI E, y cols. (2002). In Vitro and In Vivo Activities of a Novel Cephalosporin, BMS-247243, against Methicillin-Resistant and Susceptible Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(4): 971-976.

- GADDE J, SPENCE M, WHEELER B, ADKISSON NF. (1993). Clinical experience with penicillin skin testing in a larger inner city STD clinic. *JAMA*. 270: 2456-63.
- GALDIERO S, FALANGA A, CANTISANI M, TARALLO R, DELLA-PEPA ME, D'ORIANO V, GALDIERO M. (2012). Microbe-Host Interactions: Structure and Role of GramNegative Bacterial Porins. *Curr Protein Pept Sci*. 13(8): 843-854.
- GARCÍA-SÁNCHEZ JE, LÓPEZ R, PRIETO J. (1999). Antimicrobianos en medicina. Barcelona. Prous Science: Sociedad Española de Quimioterapia.
- GARRETT EF, DIRIKOLU L, GROVER GS. (2015). Milk and serum concentration of ceftiofur following intramammary infusion in goats. *J Vet Pharmacol Ther*. 38(6): 569-74.
- GIBALDI M, PERRIER P. (1982). Pharmacokinetics 2nd ed. Marcel Dekker. New York.
- GIGUERE S. (2008). In Large Animal Internal Medicine, 4th ed., Ed: B.P. Smith, Elsevier Health Sciences, St. Louis.
- GIGUÉRE S, PRESCOTT JF, BAGGOT JD, WALKER RM, DOWLING PM. (2006). Antimicrobial in veterinary medicine. 4th Edition. Eds. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- GIULABI F, DOCGUIR JD, RICCIO ML, PAGANI L, ROSSOLINI GM. (2005). OXA-46, a New Class D beta-Lactamase of Narrow Substrate Specificity Encoded by a blaVIM-1-Containing Integron from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(5): 1973-1980.
- GOBERNADO M. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases on the rise. *Rev Esp Quimioter*. 18(2): 115-117.
- GOODMAN LS, GILMAN AG. (1991). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11^a Edición.: Editorial Médica Panamericana. México.
- GOMEZ J, GARCÍA-VÁZQUEZ E, HERNÁNDEZ-TORRES A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*. 28(1): 1-9.
- GOUDAH A. (2007). Pharmacokinetics of ceftiofur after single intravenous and intramuscular administration in camels (*Camelus dromedarius*). *J. vet. Pharmacol. Therap*. 30: 371-374.
- GUNDSTROM T, JAURIN B, EDLUND T, NORMAK S. (1980). Physical mapping and expression of hybrid plasmids carrying chromosomal beta-lactamase genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 143(3): 1127-1134.
- GUERRINI VH, FILIPPICH LJ, CAO GR, ENGLISH PB, BOURNE DW. (1985). Pharmacokinetics of cefarionide, ceftriaxone and cefoperazone in sheep. *J Vet Pharmacol Ther*. 8(2): 120-7.

- GUPTA V. (2007). An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res.* 126(5): 417-427.
- HALL TL, TELL LA, WETZLICH SE, MCCORMICK JD, FOWLER LW, PUSTERLA N. (2011). Pharmacokinetics of ceftiofur sodium and ceftiofur crystalline free acid in neonatal foals. *J Vet Pharmacol Ther.* 34(4): 403-409.
- HALSTEAD SL, WALKER RD, BAKER JC, HOLLAND RE, STEIN GE, HAUPTMAN JG. (1992). Pharmacokinetic evaluation of ceftiofur in serum, tissue chamber fluid, and bronchial secretions from healthy beef-bred calves. *Can J Vet Res.* 56: 269-74.
- HARTMAN BJ, TOMASZ A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 158(2): 513-516.
- HARVEY RA, CHAMPE PC. (1992). *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- HENZE UU, BERGER-BACHI B. (1996). Penicillin-Binding Protein 4 Overproduction Increases β -Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(9): 2121-21215.
- HIBBARD, B., ROBB, E. J., CHESTER JR., S. T., DAME, K. J., BOUCHER, J. F., ALANIZ, G. R. (2002). Dose determination and confirmation of a long-acting formulation of Ceftiofur (Ceftiofur crystalline free acid) administered subcutaneously for the treatment of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 25: 175-180.
- HODGKIN DC, MASLEN EN. (1961). The x-ray analysis of the structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 79: 393-402.
- HOMATOUNI H, GROSS PA, SETIA U, LYNCH TJ. (1979). Leukopenia due to penicillin and cephalosporin homologues. *Arch Intern Med.* 139(7): 827-8.
- HORNISH RE, KOTARSKI SF. (2002). Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem.* 2(7): 717-31.
- ISMAIL MM. (2005). Pharmacokinetics, urinary and mammary excretion of ceftriaxone in lactating goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52(7): 354-358.
- ITO S, LEE A. (2003). Drug excretion into breast milk--overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(5): 617-627.
- JACOBSON GA, MARTINOD S, CUNNINGHAM CP. (2006). Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 40: 1249-1252.
- JACOBY GA, MUÑOZ-PRICE LS. (2005). The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 352(4): 380-391.

- JAGLAN PS, KUBICEK MF, ARNOLD TS, COX BL, ROBINS RH, JOHNSON DV, GILBERTSON TJ. (1989). Metabolism of ceftiofur. Nature of urinary and plasma metabolites in rats and cattle. *J Agric Food Chem.* 37: 1112–8.
- JAGLAN PS, ROOF RD, YEIN FS, ARNOLD TS, BROWN SA, GILBERTSON TJ. (1994). Concentration of ceftiofur metabolites in the plasma and lungs of horses following intramuscular treatment. *J Vet Pharmacol Ther.* 17(1): 24-30.
- JOURIN B, GUNDSTROM T. (1981). AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78(8): 4897-4901.
- JOHNSON AP, WARNER M, CARTER M, LIVERMORE DM. (2002). *In vitro* activity of cephalosporin RWJ-54428 (MC-02479) against multidrug-resistant GramPositive Cocci. *Antimicrob Agents Chemother.*; 46(2): 321-326.
- JONES RN. (1989). A review of cephalosporin metabolism: a lesson to be learned for future chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 12(1): 25-31.
- KAMEI C, SUGIMOTO Y, TASAKA K. (1987). The effects of cephem antibiotics and related compounds on the aldehyde dehydrogenase in rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 36(12): 1933-9.
- KANNANGARA DW, SMITH B, COHEN K. (1982). Exfoliative dermatitis during ceftiofur therapy. *Arch Intern Med.* 142(5): 1031-2.
- KANWAR N, SCOTT HM, NORBY B, LONERAGAN GH, VINASCO J, MCGOWAN M, COTTELL JL, CHENGAPPA MM, BAI J, BOERLIN P. (2013). Effects of Ceftiofur and Chlorotetracycline Treatment Strategies on Antimicrobial Susceptibility and on tet(A), tet(B), and bla_{CMY-2} Resistance Genes among *E. coli* Isolated from the Feces of Feedlot Cattle.; *PLoS ONE* 8(11): e80575. doi:10.1371/journal.pone.0080575
- KARCHMER AW. 2000. Cephalosporins. In: Mandell, Douglas & Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, eds. Fifth edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 274-299
- KELKAR PS, LI JT. (2001). Cephalosporin allergy. *N Engl J Med.* 345(11): 804-9.
- KLEIN NC, CUNHA BA. (1995). Third-generation cephalosporins. *Med Clin North Am.* 79(4): 705-719.
- KOBAYASHI Y, TAKAHASHI I, NAKAE T. (1982). Diffusion of beta-lactam antibiotics through liposome membranes containing purified porins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22(5): 775-780.
- KOTTWITZ J, BLUE-MCCLENDON A, MONARSKI CH, JENSEN J, BOOTHE D. (2015). Disposition of ceftiofur and its active metabolites in fallow deer (*DAMA Dama*) following single-dose intravenous and intramuscular administration. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 46(2): 255-261.

- KWON H, LEE SH, KIM SE, LEE JH, JEE YK, KANG HR. (2012). Spontaneously reported hepatic adverse drug events in Korea: multicenter study. *J Korean Med Sci.* 27(3): 268-273.
- LANCINI G, PARENTI F, GALLO G. (1995). Antibiotics. A multidisciplinary approach. Plenum Press. New York. 277p.
- LAVY E, SHEM-TOV M, OR-BACH A, ZIV G, GLICKMAN A, SARAN A. (1997). Oral availability and bioequivalence studies in dogs of two cephalexin tablets and a cephalexin capsule. *J Vet Pharmacol Ther.* 20(1): 63-44.
- LEAF DE, LANGER NB, MARKOWSKI M, GARRATTY G, DIUGUID DL. (2010). A severe case of ceftiofur-induced immune hemolytic anemia. *Acta Haematol.* 124(4): 197-199.
- LEES P, ALIABADI FS. (2002a). Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 19: 269-284.
- LEES P, ALIABADI FS. (2002b). Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: Farmacología y terapéutica veterinaria. Eds: Botana LM, Landoni F, Martín-Jiménez T. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. Pág: 484-488.
- LI X, ZHENG W, MACHESKY ML, YATES SR, AND KATTERHENRY M. (2011). Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm. *J. Agric. Food Chem.* 59: 10176–10181.
- LIM D, STRYNADKA N. (2002). Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol.* 9(11): 870-876.
- LIMBERT M, ISERT D, KLESEL N, MARKUS A, SEEGER K, SEIBERT G y cols. (1991). Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 14–19.
- LIN RY. (1992). A perspective on penicillin allergy. *Arch Intern Med.* 152: 930-7.
- LIU Y, CUI J, WANG R. (2005). Selection of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* during tuberculosis therapy: concurrent bacterial eradication and acquisition of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56: 1172–1175.
- LITTERIO NJ. (2013). Estudio farmacocinético-farmacodinámico de la cefquinoma en cabras en función de la edad, la gestación y la lactancia. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- LIVERMORE D. (1998). Beta-Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Therap.* 41(Suppl D):25-41.
- LOCKEY R, BUKANTZ S. (1999). Allergens and Allergen Immunotherapy. 2ª Edición, Ed. Marcel Dekker. Nueva York. 273-296.

- LODE H, FASSBENDER M, SCHABERG T, BORNER K, KOEPPE P. (1994). Comparative pharmacokinetics of the new oral cephalosporins. *Drugs*. 47 Suppl 3:10-9; discussion 19-20.
- LONGER MA, ROBINSON JR. (1987). Sistema de liberación sostenida de fármacos. En Remington Farmacia 17ªed. Panamericana. Buenos Aires. Pp 2240-2264.
- LORIAN V. (1975). Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull N Y Acad Med*. 51(9): 1046-1055.
- MACGOWAN A, BOWKER K. (2002). Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in in vitro models. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 19: 291–298.
- MACPHERSON ML, GIGUERE S, POZOR MA, VICKROY TW, TROEDSSON MHT, BENSON SM, RUNCAN E, HATZEL JN, LARSON J, VAN DEN BERG E, KELLEMAN AA, LEBLANC MM, SANCHEZ LC. (2014). Pharmacokinetics of Ceftiofur Sodium in Equine Pregnancy. AAEP PROCEEDINGS. Vol. 60.
- MAHRT CR. (1992). Safety of ceftiofur sodium administered intramuscularly in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2201-2205.
- MARÍN P, ESCUDERO E, FERNÁNDEZ-VARÓN E, RAMÍREZ MJ, CÁRCELES CM. (2010). Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after a long-acting formulation for subcutaneous administration to lactating goats. *J Dairy Sci*. 2010 Jul; 93(7):3056-64.
- MARTINEZ M, MODRIC S. (2010). Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. *J Vet Pharmacol Ther*. 33(3): 213-6.
- MATSCHKE C, ISELE U, VAN HOOGEVEST P, AHR A. (2002). Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of Controlled Release*. 85: 1-15.
- MCARTHUR JE, DYMENT PG. (1975). Stevens-Johnson syndrome with hepatitis following therapy with ampicillin and cephalixin. *N Z Med J*. 81(538):390-392.
- MCDONALD JM. (1989). Efficacy of cefradoxil in the treatment of bacterial dermatitis in dogs. *JAVMA*. 194: 57-8.
- MCKELLAR, Q.; GIBSON, I.; MONTEIRO, A.; BREGANTE, M. (1999). Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrobial Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1988-1992.
- MCKELLAR, QA; SANCHEZ BRUNI, SF y JONES, D. G. (2004). Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*. 27(6): 503-514.

- MCMAHON FG. (1980). Disulfiram-like reaction to a cephalosporin. *JAMA*. 243(23): 2397.
- MEDEIROS A. (1997). Evolution and dissemination of β -Lactamases by generations of β -Lactam. *Antibiotics. Clin. Infect. Dis.* 24 (1): S19-S45.
- MEEGAN J, COLLARD WT, GROVER GS, PUSSINI N, VAN BONN WG, GULLAND FM. (2013). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline-free acid (EXCEDE sterile suspension) administered via intramuscular injection in wild California sea lions (*Zalophus californianus*). *J Zoo Wildl Med.* 44(3):714-20.
- MELLA S, ZEMELMAN C, BELLO H, DOMINGUEZ M, GONZALEZ G, ZEMELMAN R. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev Chil Infectol.* 18(1): 7-19.
- MEMMI G, FILIPE SR, PINHO MG, FU Z, CHEUNG A. (2008). *Staphylococcus aureus* PBP4 Is essential for β -lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(11): 3955-3966.
- MEYER S, GIGUÈRE S, RODRIGUEZ R, ZIELINSKI RJ, GROVER GS, BROWN SA. (2009). Pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium and concentration in body fluids of foals. *J Vet Pharmacol Ther.* 32(4): 309-316.
- MOREJON M. (2011). Ceftarolina y ceftobiprol, nuevas cefalosporinas. *Rev Cubana Farm.* 45(3): 318-320.
- MOUALLEM R. (1976). Comparative efficacy and safety of cephradine and cephalexin in children. *J Int Med Res.* 4(4): 265-271.
- MULLIGAN ME, MURRAY-LEISURE KA, RIBNER BS, STANDIFORD HC, JOHN JF, KORVICK JA. (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med.* 94(3): 313-328.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFAUER MA. (2006). Microbiología Médica. 5ª Edición. Ed Elsevier. Madrid.
- NAKAMURA K, NAKAGAWA A, TANAKA M, MASUDA H, HAYASHI Y, SAIONJI K. (1984). Effects of cephem antibiotics on ethanol metabolism. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 83(2): 183-91.
- NARASIMHAN B, PEPPAS NA. (1997). Molecular análisis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. *J. Pharm. Sci.* 86 3: 297-304.
- NAVARRÉ CB, ZHANG L, SUNKARA G, DURAN SH, KOMPELLA UB. (1999). Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 22(1):13-19.

NCCLS (WIKLER MA, COCKERILL FR, CRAIG WA, DUDLEY MN, ELIOPOULOS FM, HECHT MD, HINDLER JF, LOW DE, SHEEHAN DJ, TENOVER FC, TURNIDGE JD, WEINSTEIN MP, ZIMMER BL, FERRARO MJ, SWENSON JM. (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (Normas NCCLS sobre antibiograma), vol 26(3); Sixteenth informational supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne. PA. USA. ISBN: 1-56238-588-7.

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

NODA A, VIDAL A. (2010). Farmacocinética y farmacodinamia, implicación en un uso más racional de los antimicrobianos. *Rev Cubana Farm.* 44(4): 533-546.

NORRBY R, FOORD RD, PRICE JD, HEDLUND P. (1977). Clinical and Pharmacokinetic studies on cefuroxime. *J Antimicrob Chemother.* 3(4): 355-62.

NORRBY R. (1987). Side effects of cephalosporins. *Drugs.* 34(Suppl2): 105-120.

O'CALLAGHAN, CH. 1979. Description and classification of the newer cephalosporins and their relationship with the established compounds. *J Antimicrob Chemother.* 5: 635-71

ODENHOLT I. (2001). Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents.* 17(1): 1-8.

OKKER H, SCHMITT EJ, VOS PLAM, SCHERPENISSE P, BERGWERFF AA, JONKER FH (2002). Pharmacokinetics of ceftiofur in plasma and uterine secretions and tissues after subcutaneous postpartum administration in lactating dairy cows. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 25: 33-38.

ONIONS AHS, BRADY BL. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium* [Biotechnology Handbooks]. Vol 1. New York & London: Da Capo Press (Plenum).

ONYEJI C, NICOLAU D, NIGHTINGALE C, QUINTILIANI R. (1994). Optimal times above MICs of ceftibuten and cefaclor in experimental intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother;* 38: 1112-1117

PAPICH MG. (1984). Clinical pharmacology of cephalosporin antibiotics. *J Am Vet Med Assoc* 184(3): 344-347.

PAPICH MG, DAVIS JL, FLOERCHINGER AM. (2010). Pharmacokinetics, protein binding, and tissue distribution of orally administered cefpodoxime proxetil and cephalexin in dogs. *Am J Vet Res.* 71(12): 1484-91.

PATEL PN, PATEL UD, BHAVSAR SHK, THAKER AM. (2010). Pharmacokinetics of Cefepime Following Intravenous and Intramuscular Administration in Sheep. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics.* 9(1): 7-10

- PATERSON DL, BONOMO RA. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4): 657-686.
- PATTERSON JE. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases. *Semin Respir Crit Care Med.* 24(1): 79-88.
- PLA JM, OBACH R. (1982). PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS CON SU FUNDAMENTO FARMACOLÓGICO. (dir: J. Esplugues). Farmacología general. Fundación García Muñoz. Valencia. 7: 19-54.
- PLA JM, del POZO A. (1974): MANUAL DE INICIACIÓN A LA BIOFARMACIA (Farmacocinética aplicada). Romargraf. Barcelona.
- PÉHOURCQ F, JARRY C. (1998). Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A.* 7/3; 812(1-2):159-78.
- PETERSEN SW, ROSIN E. (1993). *In vitro* antibacterial activity of ceftiofur and cefotetan and pharmacokinetics in dogs. *Am J Vet Res.* 54(9): 1496-9.
- PICCO E, STIEFEL S, CERRA M, MICHEL A, RUBIO M, FORMENTINI E. (2009). Antibacterianos: certezas e hipótesis acerca de la relación farmacocinética-farmacodinámica (PK-PD) de los mismos. *Panorama Actual Med.* 33(327): 994 - 1007.
- PILLE F, DE BAERE S, CEELEN L, DEWULF J, CROUBELS S, GASTHUYS F, DE BACKER P, MARTENS (2005). A. Synovial fluid and plasma concentrations of ceftiofur after regional intravenous perfusion in the horse. *Vet Surg.* 34(6):610-7.
- PITOUT JD, SANDERS CC, SANDERS WE. (1997). Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am J Med.* 103(1): 51-59.
- PLA, JM y POZO, A. (1974). Manual de iniciación a la biofarmacia (Farmacocinética aplicada). Romargraf. Barcelona.
- PLUMB DC. (2010). Manual de Farmacología Veterinaria, Tomo I. Sexta edición. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina.
- POPICK AC, CROUTHAMEL WG, BEKERSKY I. (1987). Plasma protein binding of ceftiofur. *Xenobiotica.* 17(10): 1139-45.
- PORTIS E, LINDEMAN C, JOHANSEN L, STOLTMAN G. (2013). Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from United States and Canada, 2001 to 2010. *J Swine Health Prod.* 21(1):30-41.
- PRESCOTT JF, BAGGOT JD. (1993). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 2º Ed. JF Prescott y JD Baggot Ed. Iowa State University Press/Ames. ISBN: 0-8138-0889-8.
- QUINTILIANI MD. (2004). Using pharmacodynamic and pharmacokinetic concepts to optimize treatment of infectious diseases. *Infect. Med.* 21(5): 219-233.

- RIVAS KB, RIVAS MA, DAVILA EL, RODRIGUEZ M. (2002). Cefalosporinas. De la primer a la cuarta generación. *RFM*. 25(2): 142-153.
- RIVERA-GARCIA S, ANGELOS JA, ROWE JD, BYRNE BA, WETZLICH SE, VAN LIEW DB, TELL LA. (2014). Pharmacokinetics of ceftiofur crystalline-free acid following subcutaneous administration of a single dose to sheep. *Am J Vet Res*. 75(3):290-5.
- RIVIERE J, PAPICH M. (2009). Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th Edition. Ed. Blackwell Publishing Professionals. Iowa. ISBN 978-0-8138-2061-3.
- ROSIN E, UPHOFF TS, SCHULTZ-DARKEN NJ, COLLINS MT. (1993). Cefazolin antibacterial activity and concentrations in serum and the surgical wound in dogs. *Am J Vet Res*. 54(8): 1317-1321.
- ROUZZI A, KHALIFA B, AL-HAMDAN H, BONDAGJI N. (2000). The routine use of cefazolin in cesarean section. *Int. J Gynaecol. Obstet*. 69(2): 107-112.
- ROWLAND M, TOZER T. (2011). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins
- RULE R, VILLAGRA S, BARRENA P, LACCHINI R, REYNALDI FJ. (2011). Pharmacokinetics of ceftazidime administered to lactating and non-lactating goats. *J S Afr Vet Assoc*. 82(4): 219-23.
- SADER HS, FARRELL DJ, MENDES RE, FLAMM RK, CASTANHEIRA M, JONES RN. (2015). Antimicrobial activity of ceftaroline tested against bacterial isolates causing respiratory tract and skin and skin structure infections in US medical centers in 2013. *Diagn Microbiol Infect Dis*. S0732-8893(15)00031-0.
- SALMON SA, WATTS JL, CASE CA, HOFFMAN LJ, WEGENER HC, YANCEY RJ Jr. (1995). Comparison of MICs of Ceftiofur and Other Antimicrobial Agents against Bacterial Pathogens of Swine from the United States, Canada, and Denmark. *J Clin Microbiol*. 33(9):2435-44.
- SALMON SA, WATTS JL, YANCEY RJ Jr. (1996). *In vitro* activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. *J Vet Diagn Invest*. 8(3):332-6.
- SÁNCHEZ, LC. (2014). Pharmacokinetics of ceftiofur sodium in equine pregnancy. *J Equine Vet Science*, 34 (1): 216.
- SÁNCHEZ-SANCHO F, PEREZ-INESTROSA E, SUAU R, MONTAÑEZ MI, MAYORGA C, TORRES MJ, ROMANO A, BLANCA M. (2003). Synthesis, characterization and immunochemical evaluation of cephalosporin antigenic determinants. *J Mol Recognit*. 16(3): 148-56.
- SCHURMAN DJ, BURTON DS, KAJIYAMA G, MOSER K, NAGEL DA. (1976). Sodium cephalapirin disposition and distribution into human bone. *Curr Ther Res Clin Exp*. 20(2): 194-203.

- SHAN Q, LIANG C, WANG J, LI J, ZENG Z. (2014). *In vivo* activity of cefquinome against *Escherichia coli* in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(10): 5943-5946.
- SHARIATMADAR S, STORRY JR, SAUSAIS L, REID ME. (2004). Cefotetan-induced hemolytic anemia following prophylaxis for cesarean delivery. *Immunohematology.* 20(1): 63-6.
- SIFAOU F, ARTHUR M, RICE L, GURMANN L. (2001). Role of penicillinbinding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2594–2597.
- SILLEY P, RUDD AP, SYMINGTON WM, TAIT AJ. (1988). Pharmacokinetics of cephalexin in dogs and cats after oral, subcutaneous and intramuscular administration. *Vet Rec.* 122(1):15-17.
- SILVERBLATT F, TURCK M, BULGER R. (1970). Nephrotoxicity due to cephaloridine: a light- and electron-microscopic study in rabbits. *J Infect Dis.* 122(1): 33-44.
- SILVIU DAN F, MAC PHILIPS S, WARRINGTON RJ. (1993). The frequency of skin-test reactions to side-chain penicillin determinants in immediate hypersensitivity to penicillins. *J Allergy Clin Immunol.* 91: 694-701.
- SIMPSON IJ. (1971). Nephrotoxicity and acute renal failure associated with cephalothin and cephaloridin. *N Z Med J.* 74(474): 312-5.
- SLOVIS NM, WILSON WD, STANLEY S, LAKRITZ J. (2006). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of ceftiofur in horses after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration. In: Corey DG, ed. (2006) *Proc.of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio, Texas, USA, 2-6 December, 2006.* Lexington; USA: American Association of Equine Practitioners (AAEP): 329-330.
- SMITH GW, GEHRING R, RIVIERE JE, YEATTS JL, BAYNES RE. (2004). Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 224 (11): 1827 - 1830.
- SNYDMAN DR, MCDERMOTT L, CUCHURAL GJ, HECHT DW, IANNINI PB, HARRELL LJ. (1996). Analysis of trends in antimicrobial resistance patterns among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group species from 1990 to 1994. *Clin Infect Dis.* 23(1): S54-S65.
- SOBACK S, ZIV G, BOR A, SHAPIRA M. (1988). Pharmacokinetics of cephalexin glycinate in lactating cows and ewes. *Zentralbl Veterinarmed A.* 35(10): 755-760.
- SOBACK S, ZIV G, WINKLER M, SARAN A. (1989). Pharmacokinetics of ceftiofur administered intravenously and intramuscularly to lactating cows. *Isr J Vet Med.* 45: 118–123.

- SPRATT, B. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *E. coli* K 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72(8): 2999-3003.
- STEADMAN E, RAISCH DW, BENNETT CL, ESTERLY JS, BECKER T, POSTELNICK M, MCKOY JM, TRIFILIO S, YARNOLD PR, SCHEETZ MH. (2010). Evaluation of a potential clinical interaction between ceftriaxone and calcium. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(4): 1534-40.
- STEGEMANN MR, SHERINGTON J, BLANCHFLOWER S. (2006a). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ceftiofur in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 29(6): 501-11.
- STEGEMANN MR, SHERINGTON J, COATI N, BROWN SA, BLANCHFLOWER S. (2006b). Pharmacokinetics of ceftiofur in cats. *J Vet Pharmacol Ther*. 29(6): 513-24.
- SUAREZ C, GUDIOL F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(2): 116-129.
- SUN Y, PENG Y, AKSORNKOAE N, JOHNSON JR, GREGG BORING J, SCRUGGS D, COOPER RC, LAIZURE SC, SHUKLA AJ. (2002). Controlled release of oxytetracycline in sheep. *Journal of Control Release*. 85 (1-3): 125-134.
- SWATI S, PATEL UD, BHAVSAR SK, THAKER AM. (2010). Pharmacokinetics and Bioavailability of Ceftriaxone in Patanwadi Sheep. *Online veterinary journal*. 5(2): Article 66.
- SWEENEY MT, BRUMBAUGH GW, AND WATTS JL. (2008). In Vitro Activities of Tulathromycin and Ceftiofur Combined with Other Antimicrobial Agents Using Bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* Isolates. *Veterinary Therapeutics*. 9(3): 212-222.
- TAFUR JD, TORRES JA, VILLEGAS MV. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gramnegativas. *Infectio*. 12(3), 223-233.
- TESSIER PR, NICOLAV DP, ONYEJI CO, NIGHTINGALE CH. (1999). Pharmacodynamics of intermittent -and continuous- infusion ceftiofur alone and in combination with once daily tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* infection model. *Chemotherapy*. 45(4): 284-95.
- TITOS JC. (2010). Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones de liberación retardada de enrofloxacin en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- TOMASZ A. (1997). Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 24(1): S85-S88.
- TOUTAIN PL, BOUSQUET-MELOU A. (2004a). Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. 27: 427-439.
- TOUTAIN PL, BOUSQUET-MELOU A. (2004b). Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. 27: 455-466.

- TOUTAIN PL, DEL CASTILLO J, BOUSQUET-MÉLOU A. (2002). The pharmacokinetic/ pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci.* 73 (2): 105-114.
- TREES DL, IANDOLO JJ. (1988). Identification of a *Staphylococcus aureus* transposon (Tn4291) that carries the methicillin resistance gene(s). *J Bacteriol.* 170(1): 149-54.
- UBAKATA K, YAMASHITA N, KONNO M. (1985). Occurrence of a 13-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 851-857.
- USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs – Antibiotics. (2003). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* Cephalosporins (Veterinary—Systemic). 26(2): 51-71.
- VACAS FERNÁNDEZ C. (2003). Evolución del sector caprino en la Región de Murcia (1986-2000) y su caracterización productiva al final del milenio. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- VAN DEN BERG, EMH. 2014. Pharmacokinetics of ceftiofur sodium in pregnant pony mares. Master thesis. Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht University.
- VERVLOET D, MAGNAN A. (2003). *Traité d'allergologie*, 1ª Edición, Paris. Ed. Flammarion; 737-773. ISBN 13: 9782257105257.
- WACKOWIEZ G, RICHARD JJ, FABREGUETTES G. (1997). Pharmacokinetics of cephalexin in plasma and urine after single intravenous and oral (tablets) administration in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 20(1): 63-64.
- WAGNER JG. (1993). *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist* 1st Edition CRC Press. pp 96-99. ISBN-13: 978-1566760324; ISBN-10: 1566760321.
- WATERMAN NG, SCHARFENBERGER LF. (1978). Concentration relationships of cefaclor in serum, interstitial fluid, bile, and urine of dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 14(4): 614-616.
- WASHBURN, K., JOHNSON, R., CLARKE, C. R., ANDERSON, K., LUCAS, M., BRYSON, W., ROBINSON, J., DAME, K., HUBBARD, V., CALLAHAN, K., ROBB, E. (2005). Penetration of ceftiofur into sterile vs. *Mannheimia haemolytica*-infected tissue chambers in beef calves after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension in the ear pinna. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 28: 247–251.
- WEISS M, ADKINSON NF. (1988). Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. *Clin. Allergy.* 18: 515-40.
- WHITNEY CG, FARLEY MM, HADLER J, HARRISON LH, LEXAU C, REINGOLD A, LEFKOWITZ L, CIESLAK PR, CETRON M, ZELL ER, JORGENSEN JH, SCHUCHAT A. (2000). Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 343(26): 1917-1924.

- WHITTEN T, FREEMAN DA, HANLOB D, PARTON K. (1995). The effect on the pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium in dairy cattle of simultaneous intravenous acetyl salicylate (aspirin) or probenecid, *J Vet Pharmacol Therap*, 18, 61-67.
- WHITTEM T. (1999). Pharmacokinetics and milk discard times of pirlimycin after intramammary infusion: a population approach. *J Vet Pharmacol Ther*. 22 (1): 41 - 51.
- WHITTEM T, FREEMAN DA, HANLON D, PARTON K. (1995). The effects on pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium in dairy cattle of simultaneous intravenous acetyl salicylate (aspirin) or probenecib. *J Vet Pharmacol Ther*. 18: 61-67.
- WILSON WD, BAGGOT JD, ADAMSON PJW, HIRSH DC, HIETALA SK. (1985). Cefadroxil in the horse: pharmacokinetics and in vitro antibacterial activity. *J Vet Pharmacol Ther*. 8(3): 246-253.
- WRIGHT AJ. (1999). The penicillins. *Mayo Clin Proc*. 74: 290-307.
- XIE S, ZHU L, DONG Z, WANG X, WANG Y, LI X, ZHOU W. (2011). Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: influences of fatty acids. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 83(2): 382-387.
- YAMAOKA K, NAKAGAWA T, UNO T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Biochemistry*. 100: 609-618.
- YAMAOKA K, NAKAGAWA T, UNO T. (1978b). Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharm. Biopharm*. 6: 547-558.
- YAMAOKA K, TAMIGAWARA Y, UNO J. (1981). A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputers. *J. Pharmacobio-Dyn*. 4: 879-885.
- YANCEY RJ, KINNEY ML, ROBERTS BJ, GOODENOUGH KR, HAMEL JC, FORD CW. (1987). Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation *in vitro* and *in vivo* in mice. *Am. J. Vet. Res*. 48 (7): 1050-1053.
- YIN LF, HUANG SJ, JIANG SG, ZHAO CJ, PEI ZQ, ZHANG Q. (2011). *In vitro* and *in vivo* evaluation of levofloxacin sustained-release capsules. *Drug Dev Ind Pharm*. 37(1): 33-40.
- ZHANG L, PARSONS DL, NAVARRE C, KOMPELLA UB. (2002). Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *Journal of Control Release*. 85 (1-3): 73-81.

10.-ABREVIATURAS.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS:

- AIC**: Criterio de información de AKAIKE.
- C.V.:** Coeficiente de variación.
- n**: número de datos analizados.
- N.S.:** Nivel de significación.
- P**: Probabilidad.
- R²**: Coeficiente de correlación.
- RSD**: Desviación estándar de medidas repetidas.
- S.D.:** Desviación estándar.
- S.E.:** Error estándar.

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

- AUC**: Área bajo la curva, calculada según métodos no compartimentales.
- Cl**: Aclaramiento plasmático calculado en función del área bajo la curva.
- C_{máx}**: Concentración periférica máxima (administración intravenosa), concentración plasmática máxima (administración intramuscular).
- F**: Biodisponibilidad.
- k_a**: Constante aparente de absorción.
- k₁₀**: Constante de eliminación.
- k₁₂**: Constante de transferencia al compartimento periférico.
- k₂₁**: Constante de retorno desde el compartimento periférico.
- λ₁**: Constante híbrida de disposición rápida.
- λ₂**: Constante híbrida de disposición lenta.
- MAT**: Tiempo medio de absorción.
- MRT**: Tiempo medio de residencia.
- t_{máx}**: Tiempo en el que se alcanza la concentración periférica máxima (administración intravenosa), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (administración intramuscular y subcutánea).
- t_{1/2}**: Semivida, tiempo de vida media o vida media del fármaco.
- t_{1/2ka}**: Tiempo de vida media aparente de absorción.
- t_{1/2λ1}**: Tiempo de vida media de la fase de disposición rápida.
- t_{1/2λz}**: Tiempo de vida media de la fase disposición lenta.
- V_c**: Volumen de distribución aparente en el compartimento central.

- V_p**: Volumen de distribución aparente en el compartimento periférico.
- V_{ss}**: Volumen de distribución aparente en estado estacionario.
- V_z**: Volumen de distribución aparente en función del área bajo la curva.
- W_i**: es el factor de ponderación.
- V_{max}**: velocidad máxima de absorción de un fármaco obtenida mediante técnicas de deconvolución

OTRAS:

- CMI (MIC)**: Concentración Mínima Inhibitoria. Concentración menor de antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- CPM (MPC)**: Concentración preventiva de mutantes: concentración mínima de antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento de las cepas menos susceptibles cuando se inocula una elevada cantidad de bacterias ($\geq 10^9$ CFU/mL).
- IPM (MPI)**: índice de prevención de mutantes, relación entre la concentración preventiva de mutantes y la concentración mínima inhibitoria
- VSM (MSW)**: ventana de selección de mutantes: rango de concentraciones plasmáticas de fármaco con un límite inferior correspondiente a la concentración mínima inhibitoria, y uno superior correspondiente a la concentración preventiva de mutantes.
- EPA**: Efecto postantibiótico.
- g**: Constante gravitatoria (980 cm/s^2).
- HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.
- FL**: Fluorescencia.
- LOQ**: Límite de cuantificación.
- LOD**: Límite de detección.
- NAC**: Neumonía adquirida en comunidad o extrahospitalaria.
- IM**: Intramuscular.
- IV**: Intravenosa.
- p.o.**: por vía oral.
- SC**: Subcutánea
- PK-PD**: Integración Farmacocinética-Farmacodinámica.
- SNC**: Sistema Nervioso Central.
- spp.**: especies.