

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



FARMACOCINÉTICA Y DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE FLUMEQUINA  
EN DORADAS (*SPARUS AURATA*, *Linnaeus 1758*)

TESIS DOCTORAL DE:

**ALBERTO MANUEL LÓPEZ-ASENJO GARCÍA**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**ARTURO ANADÓN NAVARRO  
MARÍA ARÁNZAZU MARTÍNEZ CABALLERO  
IRMA ARES LOMBÁN**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**FARMACOCINÉTICA Y DEPLECIÓN DE  
RESIDUOS DE FLUMEQUINA EN DORADAS**

*(SPARUS AURATA, Linnaeus 1758)*

**TESIS DOCTORAL**

**ALBERTO MANUEL LÓPEZ-ASENJO GARCÍA**

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**FARMACOCINÉTICA Y DEPLECIÓN DE  
RESIDUOS DE FLUMEQUINA EN DORADAS**

*(SPARUS AURATA, Linnaeus 1758)*

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor**

**por la Universidad Complutense de Madrid**

**Departamento de Toxicología y Farmacología**

**ALBERTO MANUEL LÓPEZ-ASENJO GARCÍA**

**Madrid, 2013**

Trabajo financiado por el Proyecto CONSOLIDER CSD2007-063, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por el Proyecto Ref. S2009/AGR-1469 (ALIBIRD), Comunidad de Madrid, por el Proyecto GR58/08 UCM-BSCH, Universidad Complutense - Banco de Santander Central Hispano y por el Contrato de Colaboración entre el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y la Universidad Complutense de Madrid.

### **Deseo expresar mi agradecimiento:**

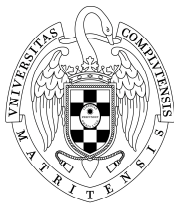
A mis Directores de Tesis Doctoral, Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, Director del Departamento de Toxicología y Farmacología, por su permanente apoyo y estímulo a quien quiero rendir mi más sincero reconocimiento y testimonio de mi amistad, así como a la Profesora Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología y a la Profesora Ayudante Dra. Irma Ares Lombán que de forma tan generosa han contribuido a que esta Tesis pueda ser presentada.

Quisiera expresar también mi agradecimiento a la Prof. Dra. María Rosa Martínez Larrañaga por sus acertados comentarios. Su claridad y entusiasta colaboración me ha permitido solventar cuantas dudas y dificultades se han ido planteando a largo de este proceso.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida.

Al Dr. Manuel Machado Campaña, Investigador del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) y a todo su equipo por su ayuda en el mantenimiento, tratamiento y recogida de muestras de los peces, acciones encuadradas en la fase experimental de esta memoria.

A mi mujer Yolanda, y mis hijos Pelayo, Beltrán y Constanza, cuyo cariño es el mejor apoyo posible, a mis hermanos, José Antonio, Ignacio y Javier, mis cuñadas Fernanda, Cristina y Marian así como a mis sobrinas María, Marta, Carlota ,Marina y demás familia. Quisiera concluir con un emotivo recuerdo a mis padres, auténticos referentes en mi vida.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

**Departamento de Toxicología  
y Farmacología  
Facultad de Veterinaria  
28040 Madrid**

Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dra. María Aranzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Ayudante Doctor de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN que D. ALBERTO MANUEL LÓPEZ-ASENJO GARCÍA**

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada “**Farmacocinética y Depleción de Residuos de Flumequina en Doradas (*Sparus Aurata, Linnaeus 1758*)**” en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a veinte de marzo del dos mil trece.

Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro

Prof. Dra. María Aranzazu Martínez Caballero

Prof. Dra. Irma Ares lombán

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Aspectos generales de las quinolonas.....	1
1.2. Flumequina: estructura química y propiedades físico-químicas.....	6
1.3. Acción farmacológica .....	7
1.3.1. Mecanismo de acción .....	7
1.3.1.1. ADN girasa.....	10
1.3.1.2. Topoisomerasa IV.....	13
1.3.1.3. Penetración al interior de la célula bacteriana .....	15
1.3.1.4. Mecanismo de resistencia .....	18
1.3.2. Espectro antimicrobiano e indicaciones terapéuticas.....	21
1.4. Farmacocinética .....	48
1.5. Toxicidad y reacciones adversas .....	60
1.6. Residuos de flumequina en productos alimenticios de origen animal.....	96
1.7. Justificación del trabajo y objetivos .....	103
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	110
2.1. Protocolo y diseño experimental.....	110
2.1.1. Estudio farmacocinético de flumequina en doradas ( <i>Sparus aurata</i> , Linnaeus 1758) .....	110
2.1.2. Estudio de distribución y depleción tisular en doradas ( <i>Sparus aurata</i> , Linnaeus 1758) .....	118
2.2. Ensayo analítico de flumequina en plasma y tejidos de doradas ( <i>Sparus aurata</i> , Linnaeus 1758).....	121
2.2.1. Procedimiento de extracción de flumequina. Condiciones cromatográficas.....	123
2.3. Análisis de datos .....	126
2.4. Fármacos y reactivos .....	133
<b>3. RESULTADOS</b> .....	134
3.1. Farmacocinética de flumequina tras administración única oral en doradas ( <i>Sparus aurata</i> , Linnaeus 1758) .....	134
3.1.1. Niveles plasmáticos de flumequina tras administración única oral .....	134
3.1.2. Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras administración única oral. ....	137

<b>3.2. Farmacocinética de flumequina tras administración múltiple oral de flumequina durante 5 días en doradas (<i>Sparus aurata</i>, Linnaeus 1758) .....</b>	<b>139</b>
3.2.1. <i>Niveles plasmáticos de flumequina tras administración múltiple oral .....</i>	139
3.2.2. <i>Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras administración múltiple oral .....</i>	144
3.2.3. <i>Índices PK/PD correlacionados con la eficacia del antibiótico.....</i>	150
<b>3.3. Distribución y depleción tisular de flumequina tras administración múltiple oral de flumequina en doradas (<i>Sparus aurata</i>, Linnaeus 1758) .....</b>	<b>153</b>
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>159</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>172</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>176</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>209</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aspectos generales de las quinolonas

Las quinolonas son una clase de antibióticos de amplio espectro de acción con gran uso tanto en medicina humana como en veterinaria. Esta clase de antimicrobianos presenta como característica principal que son los únicos que tienen como dianas bacterianas las enzimas ADN-girasa y topoisomerasa IV; enzimas que desempeñan un papel esencial en la unión, replicación y transcripción del ADN (PRESCOTT y YIELDING, 1990; VERGIN y METZ, 1991; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; ZIV, 1994; BROWN, 1996; DRLICA y ZHAO, 1997; MARIANS y HIASA, 1997; CARLUCCI, 1998; HOOPER, 1998; KIM, *et al.*, 2000).

En el año 1962 se obtuvo el ácido nalidixico mediante la purificación de la cloroquina (LESHER, *et al.*, 1962), siendo éste el primer compuesto de la serie naftiridina en sintetizarse. En 1964 fue introducido para uso terapéutico en las infecciones del tracto urinario, principalmente en el hombre, pero su uso no trascendió para el tratamiento de más patologías debido a su limitada actividad antibacteriana y a su baja penetración celular. Respecto a sus características farmacocinéticas, posee una buena y rápida eliminación renal; donde se alcanzan concentraciones plasmáticas en la orina superiores a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los gérmenes susceptibles a este agente antibacteriano (NORRBY, 1991; ANADÓN, 1992; FITTON, 1992; GOOTZ y MCGUIRK, 1994; CARLUCCI, 1998; HOOPER, 1998; BALL, 2000; STAHLMANN, 2002).

Sin embargo, no fue hasta el año 1970 cuando se comenzaron a desarrollar numerosas quinolonas adaptándose así a las necesidades clínicas del momento. De esta manera se obtuvieron compuestos de alta potencia antibacteriana, amplio espectro de

acción, buena penetración tisular, y amplio margen de seguridad al presentar efectos adversos moderados y pocas interacciones con otros fármacos. Teniendo en consideración estas características ha sido posible aumentar las aplicaciones terapéuticas de estos compuestos ampliando su uso en diferentes infecciones bacterianas, actuando en la mayoría de los órganos y tejidos corporales (CHRIST *et al.*, 1988; PRESCOTT y YIELDING, 1990; VANCUTSEM *et al.*, 1990; FERGUSON, 1995; CARLUCCI, 1998; HOOPER, 1998; SUMANO *et al.*, 1998, SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002). Las quinolonas que presentan mayor actividad antibacteriana, que como ventaja adicional se encuentran disponibles para su administración por vía intravenosa, poseen gran eficacia para el tratamiento de infecciones sistémicas (CHRIST *et al.*, 1988). En este orden de ideas podemos considerar que el desarrollo de este grupo de antimicrobianos ha sido uno de los avances más importantes de la última década en la quimioterapia de las enfermedades bacterianas (SUMANO *et al.*, 1998).

A partir de las primeras quinolonas sintetizadas han surgido nuevas moléculas que de acuerdo a su actividad antimicrobiana y eficacia terapéutica se han agrupado en compuestos de primera, segunda, tercera y cuarta generación (**Tabla 1**), además de los compuestos que actualmente se encuentran en fase de experimentación. Los compuestos agrupados dentro de una misma generación, presentan similitud en su actividad antibacteriana, espectro de acción y propiedades farmacocinéticas (VANCUTSEM *et al.*, 1990; CARLUCCI, 1998; BALL, 2000, OLIPHANT, 2002). Por otra parte, es importante considerar el hecho de que la estructura química de las quinolonas se ha desarrollado por dos caminos paralelos: el primero de ellos es el de las naftiridinas, que conservan el núcleo del ácido nalidíxico; y el segundo corresponde al de las

fluoroquinolonas, en las que un átomo de nitrógeno de la posición 8 del núcleo de naftiridina es sustituido por un átomo de carbono (BALL, 2000).

**Tabla 1.** Clasificación de las quinolonas.

<b>Primera generación</b>	<b>Segunda generación</b>	<b>Tercera generación</b>	<b>Cuarta generación</b>
Ácido nalidíxico* Ácido oxolínico* Ácido pipemídico* Ácido piromídico Cinoxacina	Flumequina* Norfloxacin* Fleroxacina Enrofloxacin* Ciprofloxacin* Danofloxacin* Sarafloxacin* Orbifloxacin* Ofloxacin Pefloxacin* Lomefloxacin Levofloxacin Rufloxacin	Marbofloxacin* Esparfloxacin Tosufloxacin Gatifloxacin Grepafloxacin	Trovafloxacin Clinafloxacin Moxifloxacin

\* Empleadas en terapéutica veterinaria.

Las quinolonas de primera generación, fundamentalmente presentan buena actividad frente a bacterias Gram-negativas y muy baja actividad frente a bacterias Gram-positivas, *Pseudomona aeruginosa* y microorganismos anaerobios. Los compuestos característicos de este grupo son el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico, siendo estos los compuestos de primera generación que se utilizan más ampliamente en terapéutica veterinaria; principalmente en cerdos, bovinos, ovejas, peces y aves (ANADÓN *et al.*, 1990; MEVIUS *et al.*, 1990a, b; SAMAHA *et al.*, 1991; FITTON, 1992; MEIJER *et al.*, 1994; GUYONET *et al.*, 1996, 1997; COCHET *et al.*, 1997; DELMAS *et al.*, 1997; SANDERS *et al.*, 1997; CARLUCCI, 1998; HOOPER, 1998; BALL, 2000; SOLHBERG *et al.*, 2002).

A partir de estos compuestos, se desarrollaron las quinolonas de segunda generación, denominadas fluoroquinolonas por la introducción de un átomo de fluor en la posición 6 del anillo, lo que incrementó de forma significativa su actividad frente a bacterias Gram-negativas; modificación que se ha mantenido en todas las moléculas que se generaron posteriormente. Esta generación de fluoroquinolonas se caracteriza por tener una excelente actividad frente a bacterias Gram-negativas en comparación con los compuestos de primera generación, y poseen además actividad frente a *Mycoplasma* spp. También cabe señalar que estos compuestos tienen una mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas con respecto a sus predecesores de la primera generación, aunque siguen presentando una moderada actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp. De manera similar, su actividad frente a microorganismos anaerobios continúa siendo muy limitada. En esta segunda generación se agrupan los compuestos de mayor uso en medicina veterinaria, como flumequina, enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina, danofloxacina y sarafloxacina (CHRIST *et al.*, 1988; ANADÓN *et al.*, 1990, 1999; FITTON, 1992; CARLUCCI, 1998; SUMANO *et al.*, 1998; IHRKE *et al.*, 1999; LECOEUR-BITCHATCHI y KOLF-CLAUW, 1999).

Las quinolonas de tercera generación destacan por poseer un notable incremento en su actividad, frente a bacterias Gram-positivas y microorganismos anaerobios, además de que sus características farmacocinéticas permiten la administración de una sola dosis, lo que mejora su utilidad terapéutica (ANADÓN, 1992; BROWN, 1996). La única fluoroquinolona de esta generación que se emplea actualmente en medicina veterinaria es la marbofloxacina, utilizándose principalmente en animales de compañía como perros y gatos, así como en especies productoras de alimento, tales como cerdos y bovinos (CESTER *et al.*, 1996; BROWN, 1996; DOSSIN *et al.*, 1998).

Dentro de las quinolonas de cuarta generación encontramos compuestos de reciente introducción y que tienen uso restringido en medicina humana, como trovafloxacin, esparfloxacin, clinafloxacin y moxifloxacin, aunque este último compuesto también se ha empleado en animales de compañía. Estas quinolonas de cuarta generación se caracterizan porque son compuestos que presentan aún mayor actividad frente a bacterias Gram-negativas y particularmente frente a bacterias Gram-positivas y anaerobios (PAPICH, 1998; BETRIU *et al.*, 1999; BLONDEAU, 1999; WALKER, 2000).

Aunque la clasificación anteriormente citada es la de mayor uso y conocimiento, algunos autores consideran otros aspectos mediante los cuales agrupan de manera distinta a las quinolonas. Así, CARLUCCI (1998) presenta una clasificación para estos compuestos, basándose en sus propiedades farmacocinéticas, citándose como ejemplo a la danofloxacin y la fleroxacin como quinolonas de larga acción; o basándose en sus efectos secundarios; considerando así la temafloxacin y la tosufloxacin como quinolonas con pocos efectos secundarios sobre el SNC. Por su parte BALL (2000) clasifica las quinolonas únicamente en tres generaciones. A su vez, la segunda y tercera generación las subdivide en dos, organizándolas de la siguiente manera: generación I; IIa; IIb; IIIa y IIIb. Sin embargo hay que decir que estas clasificaciones prácticamente no son utilizadas.

La flumequina, quinolona de segunda generación, es el compuesto objeto de nuestro estudio. Desde hace muchos años se ha comercializado para su uso en medicina veterinaria, y al igual que las demás quinolonas de su generación presenta actividad antimicrobiana (FITTON, 1992; HOOPER, 1998; BALL, 2000) y unas características farmacocinéticas en cerdos (GUYONET *et al.*, 1996), en ganado vacuno (MEVIUS *et al.*, 1990a,b; MEIJER *et al.*, 1994), en ovino (DELMAS *et al.*, 1997), en peces

(SOHLBERG *et al.*, 2002), en aves (SAMAHHA *et al.*, 1991; COCHET *et al.*, 1997; GUYONET *et al.*, 1997; SANDERS *et al.*, 1997), y en el hombre (SCHUPPAN *et al.*, 1985; ROYER-MORROT *et al.*, 1991; VREE *et al.*, 1992); que le confieren un amplio uso en medicina veterinaria, tanto en mamíferos como en aves y peces; y también en el hombre.

## **1.2. Flumequina: estructura química y propiedades físico-químicas**

La flumequina es un fármaco antibacteriano con estructura de 4-quinolona. La estructura química de la flumequina ha sido modificada a partir del anillo básico de la quinolona (**Figura 1**).

La estructura general de las quinolonas, esta conformada por un anillo bicíclico aromático o heteroaromático con un átomo de nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3, un grupo cetona en la posición 4, un átomo de fluor en la posición 6 y un átomo de carbono, nitrógeno u oxígeno ocupa la posición 8 del anillo heteroaromático. La presencia del grupo carboxilo en la posición 3 le confiere actividad antimicrobiana al compuesto, el fluor en la posición 6 favorece la potencia *in vitro* y la eficacia *in vivo* de las quinolonas frente a bacterias Gram-negativas y amplía el espectro a bacterias Gram-positivas. En la posición 7 se presentan sustituyentes del tipo piperazinil o 4 metil-piperazinil (CHU y FERNANDES, 1989; VERGIN y METZ, 1991; ANADÓN, 1992; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992). Estos sustituyentes actúan sobre el grado de permeabilidad celular y facilitan la posibilidad de alcanzar el lugar de acción en la bacteria, ya que este sustituyente es el responsable de unirse al extremo N-terminal de la subunidad A de la ADN girasa (VOIGT, 1992).

La flumequina es un polvo microcristalino de color blanco, con un peso molecular de 261.26 Daltons y un punto de fusión de 253-255 °C; es soluble en

soluciones alcalinas acuosas y alcohol, así como insoluble en agua. Su fórmula química empírica corresponde al ácido 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-1H, 5H-benzo (ij)-quinolizina-2-carboxílico (**Figura 1**).

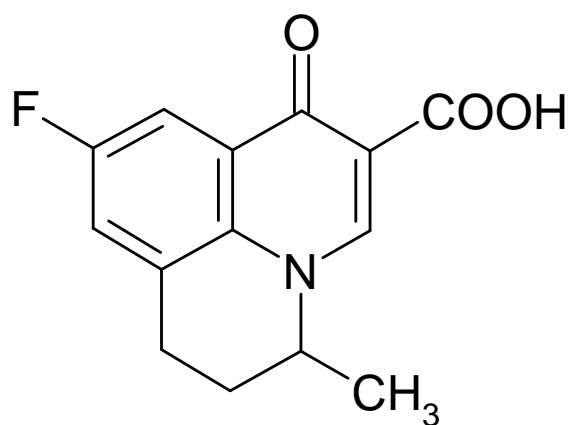
### **1.3. Acción farmacológica**

#### *1.3.1. Mecanismo de acción*

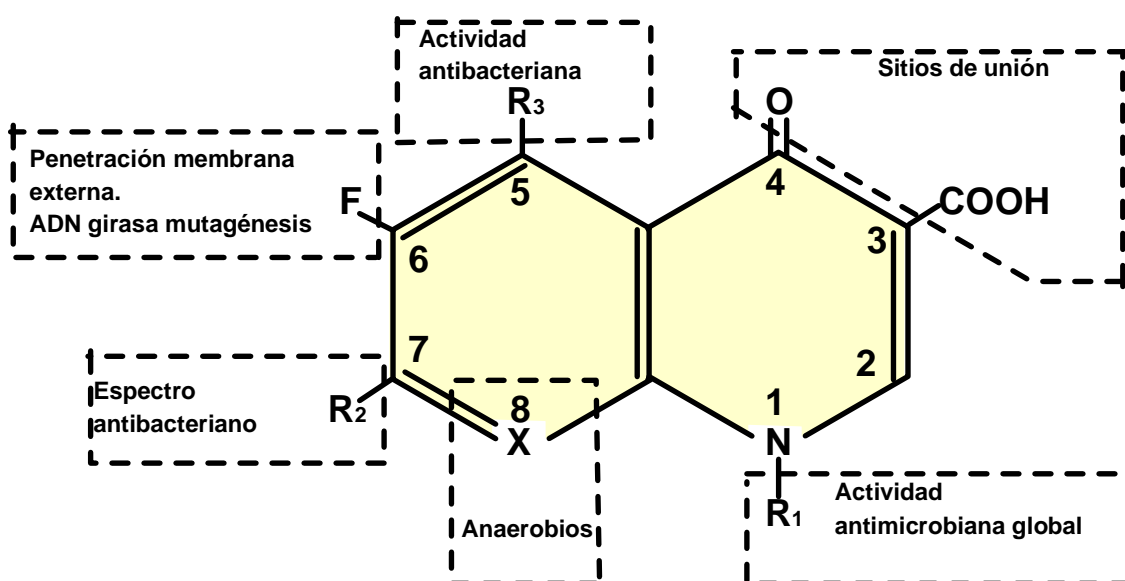
Las fluoroquinolonas tienen un mecanismo de acción diferente al de otros agentes antimicrobianos, se conoce que interactúan con dos tipos de dianas diferentes pero que están relacionadas entre sí, por un lado actúan sobre la pared bacteriana y por otro actúan sobre dos tipos de enzimas denominadas topoisomerasas bacterianas (HOOPER, 2001).

Penetran en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva, a través de los canales acuosos transmembrana (porinas) (NIKAIDO y THANASSI, 1993). Parece que las quinolonas desestructuran los enlaces entre los lipopolisacáridos de membrana, aumentando la permeabilidad de la pared celular bacteriana (SABADA *et al.*, 1998). La flumequina al igual que todas las fluoroquinolonas es un agente bactericida y actúa inhibiendo las topoisomerasas bacterianas, concretamente la ADN girasa y la topoisomerasa IV, las cuales desempeñan un papel importante durante el proceso de replicación celular, proporcionando un superenrollamiento adecuado en la región replicante y no replicante del cromosoma bacteriano. Para que la conformación de la cadena de doble hélice de ADN del cromosoma bacteriano se pueda replicar es necesario separar la doble hélice produciéndose un super-enrollamiento positivo del ADN enfrente del punto de separación que debe ser corregido por las diferentes topoisomerasas bacterianas (DRLICA y ZHAO, 1997; BLONDEAU, 2004).

(A)



(B)



**Figura 1.** (A) Estructura química de la flumequina. (B) Relación estructura básica actividad de las fluoroquinolonas. Núcleo 4-oxo-1,8-naftiridina-3 ácido carboxílico.

No obstante, el punto clave es la acción de las fluoroquinolonas sobre ambas enzimas de forma conjunta provocando la formación de complejos reversibles fluoroquinolona ADN-girasa-ADN y fluoroquinolona-topoisomerasa IV-ADN. La

formación de estos complejos con la girasa es seguida de una rápida y reversible inhibición de la síntesis de ADN, interrupción del crecimiento bacteriano e inducción de la respuesta SOS de reparación del ADN, que es un sistema errático de reparación que se genera como respuesta de emergencia para impedir la muerte celular cuando se producen un gran número de lesiones del ADN. La muerte celular de la bacteria ocurre cuando los fragmentos de ADN son liberados de los complejos topoisomerasa–girasa-ADN y la célula es incapaz de reparar adecuadamente los daños producidos en el material genético. A su vez la formación de complejos con la topoisomerasa IV, impide que se lleve a cabo el desenrollamiento de las hélices super-enrolladas de ADN en los cromosomas bacterianos, condición necesaria para que se lleven a cabo las posteriores fases de replicación celular, lo que igualmente unido al efecto anterior conduce a la muerte de la bacteria (CHEN *et al.*, 1996).

Las fluoroquinolonas exponen un efecto paradójico. Las curvas de supervivencia muestran que cuando la concentración de fluoroquinolonas está próxima a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la bacteria, el fármaco tiene un efecto estático sobre el crecimiento bacteriano (bacteriostático); cuando las concentraciones de las quinolonas superan la CMI relativa de la bacteria en determinada concentración se produce un efecto bactericida (concentración óptima bactericida), pero si las concentraciones exceden la concentración óptima bactericida puede llevar a disminuir el efecto bactericida del fármaco. Inicialmente esto está relacionado con el diferente efecto que puede tener el fármaco sobre las distintas concentraciones necesarias para inhibir el super-enrollamiento del ADN frente a aquéllas necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano. En general esto parece que se debe a que las reacciones de super-enrollamiento de la girasa son menos sensibles a las quinolonas que el crecimiento

bacteriano, puesto que la síntesis de proteínas bacterianas se encuentra muy comprometida (MAXWELL y CRITCHLOW, 1998).

#### 1.3.1.1. ADN girasa

La ADN girasa es una enzima formada por un heterotetrámero que consta de cuatro subunidades: dos subunidades GyrA, codificadas en el gen *gyrA*, y dos subunidades GyrB, codificadas en el gen *gyrB*. El peso molecular de la holoenzima es de 374 kDa (WOLFSON y HOOPER, 1989a; REECE y MAXWELL, 1991) y desempeña un papel fundamental en el proceso de replicación celular. Para que el proceso de replicación celular pueda realizarse es necesario que las dos cadenas de ADN estén separadas durante su desarrollo. Sin embargo, la separación de las cadenas ocasiona un desenrollamiento o un super-enrollamiento positivo excesivo del ADN, en sentido contrario al lugar de separación. En respuesta a este proceso se requieren ambas subunidades para la plena actividad de la ADN girasa. La subunidad GyrA se une al ADN (en ausencia de la subunidad B), interviene en el corte y unión del ADN formando un enlace transitorio con el ADN cerrado, mientras que la subunidad GyrB posee actividad ATPasa e induce super-enrollamientos en torno al núcleo de ARN, la cuál se ve estimulada por la subunidad A. Cada monómero GyrA adopta diferentes topologías para permitir la apertura y el cierre a través del cuál debe pasar el ADN y continuar la replicación celular como se puede detallar en la **Figura 2** (TALÉNS-VISCONTI *et al.*, 2002; COSTENARO *et al.*, 2005).

*In vitro*, la ADN girasa introduce tales super-enrollamientos negativos en el ADN que forma y resuelve nudos en el dúplex de ADN. Todas estas reacciones son dependientes de ATP y requieren un catión divalente, en particular  $Mg^{2+}$  (GELLERT *et al.*, 1976), aunque puede ser sustituido por  $Mn^{2+}$ . *In vitro*, también puede eliminar los

super-enrollamientos positivos (REECE y MAXWELL, 1991) en presencia de un análogo no hidrolizable de ATP (WOLFSON y HOOPER, 1989a; REECE y MAXWELL, 1991).

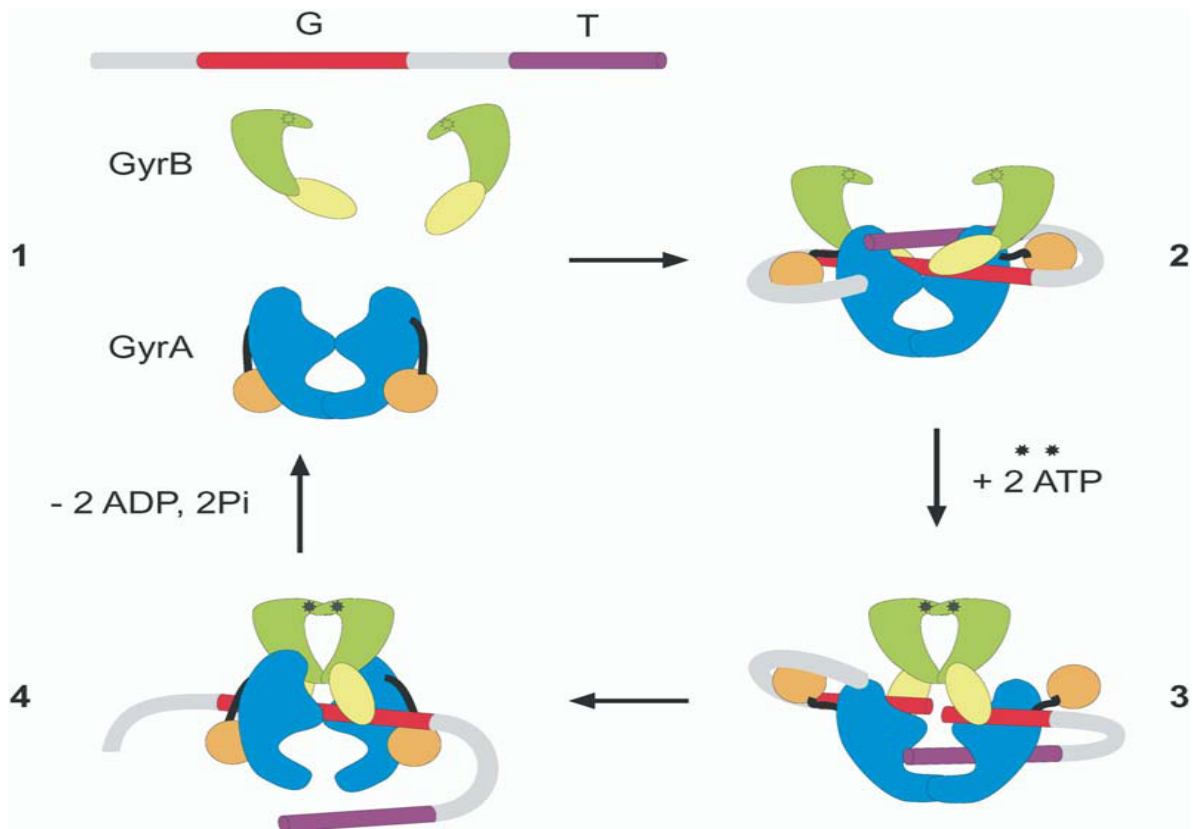
La ADN girasa no se encuentra presente en las células eucarióticas. Sin embargo, en mamíferos existe la topoisomerasa II la cual se encarga de regular el super-enrollamiento del ADN. La actividad de las quinolonas sobre estas células es muy pobre, de manera que inhiben esta enzima únicamente a concentraciones elevadas de 100 a 1000 µg/ml, por lo que se considera remota la posibilidad de que estas sustancias afecten a organismos superiores. No obstante, el incremento de actividad de algunas fluoroquinolonas sobre esta topoisomerasa II en mamíferos ha sido asociada con algunos problemas de genotoxicidad (WOLFSON y HOOPER, 1991a).

Investigaciones *in vitro* e *in vivo* revelan que la concentración de quinolona, requerida para inhibir el super-enrollamiento del ADN, es de 10 a 100 veces superior de la que se necesita para inhibir el crecimiento celular. Por ello se supone que no es necesaria la total inhibición de las actividades de la ADN girasa para que se produzca la muerte celular (DRLICA y ZHAO, 1997).

Las quinolonas ejercen una inhibición rápida de la síntesis del ADN. Este efecto por sí sólo no es suficiente para ocasionar la muerte celular, debiendo existir alguna otra acción que requeriría de la síntesis proteica para producir la muerte celular. En este sentido, se ha demostrado que tratamientos que inhiben la transcripción y la traducción o la privación de aminoácidos producen una disminución de la actividad bactericida de las quinolonas sin afectar a la inhibición de la síntesis de ADN, un ejemplo de esto se tiene con el uso simultáneo de cloranfenicol que es un inhibidor de la síntesis proteínas o con inhibidores de la síntesis de ARN como la rifampicina produciendo una

reducción de la efectividad bactericida de la quinolonas (MAXWELL y CRITCHLOW, 1998; KHODURSKY *et al.*, 2000).

Para que las quinolonas ejerzan su acción bactericida, se han descrito varios mecanismos de acción, que varían según la quinolona y el microorganismo estudiado. El mecanismo A, común a todas las quinolonas, requiere que la bacteria esté en fase de crecimiento y que presente síntesis de proteínas y ARN. Este mecanismo es el único que se ha observado con las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, y ácido oxolínico), bloqueando la replicación por la unión girasa-quinolona en el ADN bacteriano. El mecanismo B no requiere que se produzca la síntesis de proteínas o ARN para ejercer su acción bactericida y puede actuar sobre la bacteria que es incapaz de replicarse, dislocando la subunidad girasa y formando un compuesto ternario fármaco-ADN-enzima. Por último, el mecanismo C requiere que haya síntesis de proteínas y ARN para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando y está correlacionado con la acción de la topoisomerasa IV (MAXWELL y CRITCHLOW, 1998).



**Figura 2.** Vista esquemática del super-enrollamiento negativo producido por la ADN girasa. La subunidad GyrA se une al ADN, interviene en el corte y unión del ADN, formando un enlace transitorio con el ADN cerrado, mientras que la subunidad GyrB posee actividad ATPasa e inducen super-enrollamientos en torno al núcleo de ARN, la cuál se ve estimulada por la subunidad A. (COSTENARO *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.2. *Topoisomerasa IV*

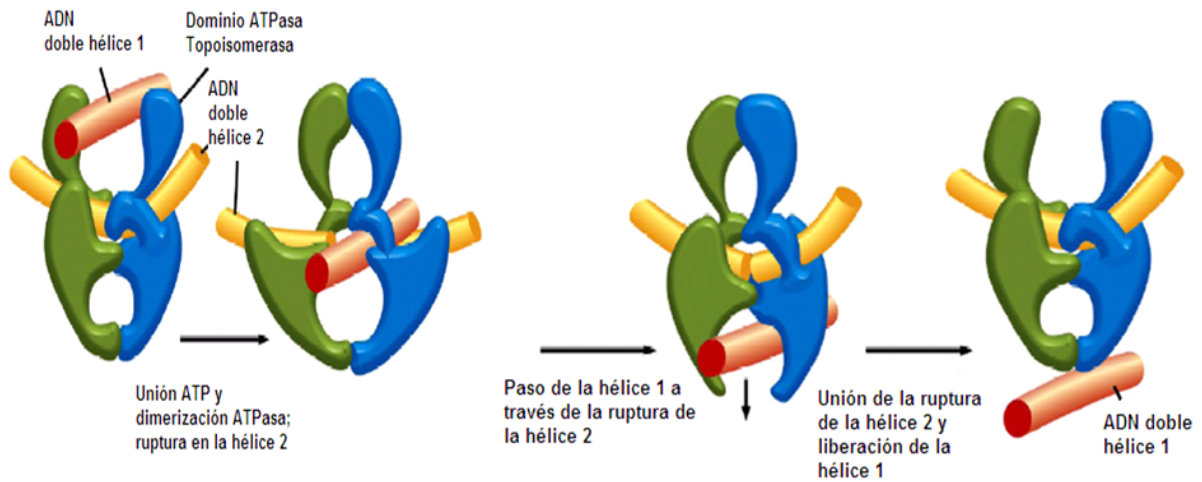
En 1990 se descubrió un homólogo de la girasa, la topoisomerasa IV (KATO *et al.*, 1990). Actualmente está reconocido que la topoisomerasa IV es la responsable de la separación del ADN formado del utilizado como plantilla para la replicación y promueve la replicación alterando super-enrollamientos positivos frente a la horquilla de replicación (KHODURSKY y COZZARELLI, 1998). La topoisomerasa IV, es también un heterotetrámero, que consta de cuatro subunidades, dos C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE*. Para ejercer su acción, el producto hidrofóbico de un gen próximo *parF* facilita la unión de la topoisomerasa IV a la membrana dependiente del ADN (DRLICA y ZHAO, 1997). Al igual que la ADN girasa, también precisa la presencia de las dos subunidades y de ATP (**Figura 3**).

Resulta interesante el estudio que demuestra que la secuencia de aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por GyrA y GyrB (las dos subunidades de la ADN girasa), respectivamente (KATO *et al.*, 1990).

Ambas, girasa y topoisomerasa IV, usan un modo de acción que implica el paso de un par de hebras de ADN, sin embargo, las enzimas difieren en el enrollamiento del ADN, la girasa lo enrolla alrededor de sí misma, mientras que la topoisomerasa no. Este enrollamiento del ADN impide que la girasa tenga una buena actividad de separación en oposición con su buena actividad de superenrollamiento y relajación; a diferencia se espera que la topoisomerasa IV reconozca los puntos de cruce de ADN, esto podría explicar porqué la actividad de separación de la topoisomerasa es mayor que su poder de actividad de relajación (HOSHINO *et al.*, 1994).

La principal característica de la topoisomerasa IV purificada es la capacidad para trasladar uniones creadas por una replicación bidireccional. Parece que la topoisomerasa IV es capaz de separar el ADN antes de terminar la fase de replicación, en tanto que la girasa es solo capaz de separar después que la fase ha finalizado. Los fenotipos mutantes indican que la separación de los cromosomas replicados de las células hijas es gracias a la acción de la topoisomerasa IV, por ejemplo, una mutación implica la sensibilidad de la temperatura en *parC* como causa de una acumulación en plásmidos de ADN y evita la separación de cromosomas (KATO *et al.*, 1988).

La topoisomerasa IV ha sido señalada como la principal enzima diana de las quinolonas en bacterias Gram-positivas, mientras que la ADN girasa lo es para las bacterias Gram- negativas (DRLICA y ZHAO, 1997; FOURNIER *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Vista esquemática de la acción de la Topoisomerasa IV. Ruptura y posterior unión de la hebra 1 de ADN para mover superenrollamientos positivos frente a la horquilla de replicación (CORBETT *et al.*, 2007).

### 1.3.1.3. Penetración al interior de la célula bacteriana

Uno de los principales aspectos que influye en la actividad de las fluoroquinolonas, es la diferente capacidad de penetración en la bicapa bacteriana y su posterior paso al interior de la célula, siendo estas diferencias en alguna medida las que controlan el porcentaje de la dosis administrada de antibiótico que finalmente penetra al interior de la célula bacteriana e interactúa con los lugares de acción. Muchos antibióticos y agentes quimioterápicos muestran una alta liposolubilidad. Estos compuestos son inherentemente capaces de atravesar por difusión pasiva la bicapa lipídica de cualquier membrana biológica (NIKAIDO y THANASSI, 1993); por ejemplo las quinolonas poseen diversos grupos funcionales con la capacidad de ganar o perder protones a pH fisiológico, la presencia de estos grupos afecta tanto el porcentaje de distribución del compuesto a través de la bicapa como el porcentaje que atraviesa la membrana.

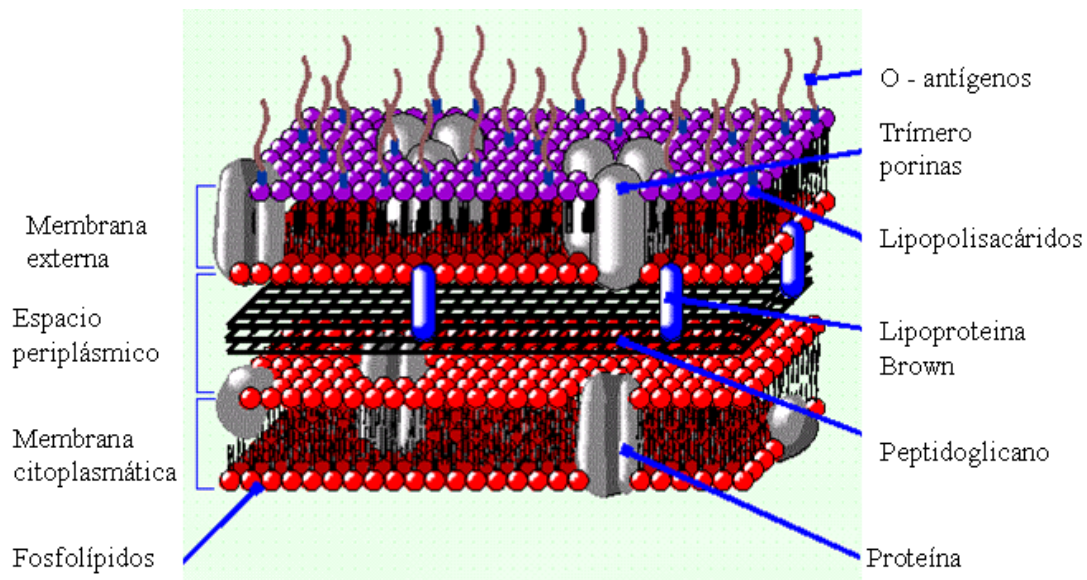
La membrana bacteriana está formada por 2 estructuras principales: la membrana interna o membrana citoplasmática y la membrana externa. Una fina pared

celular de peptidoglicano y un espacio periplásmico que contiene el sustrato para la unión enzimática, separan las dos membranas. La membrana externa contiene un grupo de tres porinas denominados trímeros (**Figura 4**). La porina OmpF o proteína F, forma parte integral de la membrana externa de la bacteria *E. coli*. La porina OmpF es un canal transportador no específico que permite el paso por difusión pasiva de pequeñas moléculas polares como el agua, iones, glucosa, otros nutrientes y productos de desecho (COWAN *et al.*, 1995). Un estudio realizado en *Escherichia coli* demostró que las quinolonas pueden penetrar, al menos en parte, a través de las porinas de la membrana celular externa bacteriana (HIRAI *et al.*, 1986a). Determinadas alteraciones o mutaciones en la membrana celular externa pueden estar asociadas con la resistencia a las quinolonas (BEDARD y BRYAN, 1989). El mecanismo de penetración de las quinolonas por la membrana bacteriana externa lo estudió HIRAI *et al.* (1986a) con cepas mutantes deficientes en lipopolisacáridos y porinas. Los datos descritos indicaron que la capa de lipopolisacáridos podría formar una barrera de permeabilidad para quinolonas hidrófobas, como el ácido nalidíxico. Estos investigadores demostraron que quinolonas con baja hidrofobicidad relativa penetraban en la célula bacteriana a través de las porinas OmpF, mientras que las quinolonas con alta hidrofobicidad relativa penetraban tanto por las porinas OmpF como por la bicapa de fosfolípidos (HIRAI *et al.*, 1986b).

Es muy probable que el mecanismo de la acción bactericida común a las quinolonas resulte de la digestión del ADN por las exonucleasas produciendo fragmentos ácidos solubles, siendo el resultado la muerte celular. Estas exonucleasas han recibido la señal para su activación debido a la presencia de fracturas en las hebras de ADN, proceso que requiere ARN-mensajero y síntesis proteica. Se conoce que las quinolonas inducen el sistema de reparación SOS, que es un sistema de reparación del

ADN que se genera como respuesta de emergencia para impedir la muerte celular cuando se produce un gran número de lesiones en el ADN, por ejemplo cuando la célula recibe radiaciones ultravioletas (LITTLE y MOUNT, 1982). Si el fármaco fuese mutagénico (COOK *et al.*, 1966), la inducción del sistema de reparación SOS se produce en una compleja cascada de activaciones genéticas, con muchos efectos sobre el metabolismo celular, tales como inhibición de la síntesis de ADN, inhibición de la división celular, filamentación y mutagénesis. En el daño celular en *E. coli*, producido por radiación ultravioleta se induce una respuesta pleiotrópica conocida como respuesta-SOS, o mecanismo de reparación del ADN, el cual incluye una inhibición rápida de la división celular con la formación de filamentos aceptados, la inducción de la respuesta SOS da lugar a señales metabólicas generadas por el daño del ADN, que activan la proteína RecA para una actividad pleiotrópica. La proteína RecA promueve la unión de LexA que es el represor común a todos los genes SOS, incluido el RecA; este último es uno de los productos génicos más importantes en las bacterias, involucrado en otras funciones vitales como la recombinación, la inducción de profagos bacterianos y la inducción de filamentos celulares, entre otras. Las proteínas producidas en las respuestas SOS mejoran la supervivencia de la célula en lesiones del ADN y son producidas hasta que el ADN es reparado (PIDDOCK y WISE, 1987).

Se ha demostrado que las quinolonas tales como el ácido nalidíxico, difloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, entre otras, inducen la respuesta SOS (PHILLIPS *et al.*, 1987), esa inducción requiere las funciones de las proteínas RecA y LexA, exonucleasas RecBC y una síntesis proteica competente.



**Figura 4.** Membrana celular de una bacteria Gram-negativa.

#### 1.3.1.4. Mecanismo de resistencia

El desarrollo de resistencia bacteriana a los fármacos antibacterianos no es un fenómeno de reciente aparición, por el contrario se encuentra ampliamente documentado desde que se implementó el uso de antibióticos a la terapéutica clínica (WARREN *et al.*, 2001).

Las quinolonas presentan algunos rangos de incidencia menor en la aparición de resistencia en comparación con otros antibióticos, que principalmente se deben a que no son susceptibles a la resistencia mediada por plásmidos (BURMAN, 1977; SMITH, 1986b; BRYAN *et al.*, 1989).

El mecanismo mediante el cual se desarrolla resistencia a las quinolonas, ocurre fundamentalmente por dos vías que involucran las mutaciones espontáneas en los genes del cromosoma bacteriano (SMITH, 1986b; FERRERO *et al.*, 1995; BROWN, 1996; BLONDEAU, 1999; LLOYD *et al.*, 1999; ROLINSKI *et al.*, 2002). Por una parte están las mutaciones en la subunidad A de la ADN girasa bacteriana, que presenta poca

afinidad de las quinolonas al complejo ADN girasa (HOOPER y WOLFSON, 1993; PIDDOCK, 1995). Las otras son mutaciones cromosómicas implicadas en la codificación del transporte activo de las quinolonas, lo que causa una acumulación intracelular. Como consecuencia se presenta una reducida producción de las proteínas en la membrana externa de la célula, a través de la cuál las quinolonas penetran en la célula bacteriana o bien estimulan el sistema de transporte celular, lo que conduce a la expulsión del fármaco activo.

Las mutaciones que involucran a la ADN girasa presentan efectos específicos sobre las quinolonas, característica que confiere alto grado de resistencia a los compuestos de esta clase de antibacterianos (CAMBAU y GUTMANN, 1993; FERRERO *et al.*, 1995; DRLICA y ZHAO, 1997; MARIANS y HIASA, 1997; LLOYD *et al.*, 1999). Estas mutaciones también son de importancia para el desarrollo de resistencias cruzadas, que suelen ser muy comunes en estos compuestos (SMITH, 1986b; BRYAN *et al.*, 1989). Las mutaciones en la subunidad A de la ADN girasa, se presentan en microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos, e involucran alteraciones en los aminoácidos. Estas alteraciones se agrupan entre los aminoácidos 67 y 106 en la terminación amino de la subunidad A, muy cerca del lugar de actividad de la enzima. Se han observado alteraciones similares en la topoisomerasa IV, en el *parC*. Una combinación de mutaciones de los genes *gyrA* y *parC* propicia la aparición de resistencia a las fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*. Las mutaciones en la ADN girasa y topoisomerasa IV que afectan a la posición de sustitución del aminoácido ocurren en regiones específicas denominadas regiones determinantes para la resistencia a quinolonas (YONEZAWA *et al.*, 1995; TABA y KUSANO, 1998). En general, estos agentes presentan una gran actividad frente a bacterias inicialmente susceptibles; esta actividad también se ha observado en patógenos aislados que presentan mutaciones en

la ADN girasa, y excepcionalmente ocurre en patógenos aislados con múltiples mecanismos de resistencia (KITAMURA, *et al.*, 1995; THOMSON *et al.*, 1991). Como ya se ha mencionado, los cambios en la membrana exterior de la célula bacteriana y el transporte activo constituyen dos mecanismos adicionales, mediante los cuales las bacterias pueden expresar resistencia a las quinolonas (BRYAN *et al.*, 1989).

Raramente aparecen mutaciones espontáneas que confieren resistencia a las fluoroquinolonas. En ensayos *in vitro*, la selección de las bacterias resistentes depende de factores tales como el compuesto utilizado, su concentración y las especies bacterianas involucradas. En un grupo de bacterias Gram-negativas expuestas a nuevas quinolonas, los rangos de frecuencia de mutantes resistentes fueron de  $\geq 10^{-6}$  para dos veces la CMI y  $<10^{-10}$  para 16 a 32 veces la CMI (HOOPER, 1995). Las mutaciones *in vivo* pueden ocurrir con mayor frecuencia por la exposición al ácido nalidíxico, precursor de la mayoría de los compuestos inhibidores de la ADN girasa. La resistencia clínica raramente se encuentra en microorganismos como las enterobacterias, que son altamente susceptibles a las quinolonas (WIEDEMANN y HEISIG, 1994). Como ejemplo se puede mencionar que las cepas mutantes resistentes de *P. Aeruginosa* y *S. aureus* se encuentran con mayor frecuencia que las cepas mutantes resistentes de *E. coli* (HOOPER *et al.* 1987; FERRERO *et al.*, 1995).

Es de tenerse en cuenta que el desarrollo de la resistencia se incrementa en proporción al incremento en el uso de las quinolonas, así como por administrar dosis inadecuadas, principalmente niveles subterapéuticos, duración inadecuada de la terapia, o el uso en pacientes que no requieren este tipo de compuestos. De esta manera es prioritario en el control de la aparición de resistencias, vigilar el adecuado uso de los agentes antibacterianos, tanto en animales como en personas.

JACOBS-REITSMA *et al.* (1994), realizaron un estudio en pollos de engorde infectados con *Campylobacter jejuni*, con la finalidad de evaluar la inducción de resistencia relacionada con la terapéutica de quinolonas. A los animales se les administró enrofloxacin en el agua de bebida a dosis de 50 mg/L. Al concluir el tratamiento no se consiguió erradicar la infección bacteriana. En los animales tratados con enrofloxacin se encontraron cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a enrofloxacin, flumequina y ácido nalidixico, lo que indica la aparición de resistencia cruzada a quinolonas relacionada con el uso de enrofloxacin; hecho que fue reportado con anterioridad (ENDTZ *et al.*, 1991).

### 1.3.2. Espectro antimicrobiano e indicaciones terapéuticas

En general, las fluoroquinolonas poseen una excelente actividad contra bacterias Gram-negativas selectivas, enterobacterias y *Pasteurella aureoginosa*, de buena a moderada actividad frente a estafilococos, micobacterias, chlamydias, micoplasmas y ureaplasmas, y de moderada a nula actividad contra *Streptococcus* (particularmente los del grupo D), enterococos y bacterias anaerobias (NEUMAN, 1978; NEU *et al.*, 1987; PRESCOTT y YIELDING, 1990; GOOTZ y MCGUIRK, 1994; SHARMA *et al.*, 1994; SUH y LORBER, 1995; BROWN, 1996; LODE *et al.*, 1998; BLONDEAU, 1999; WALKER, 2000; OTTAVIANI *et al.*, 2001; TAKEI *et al.*, 2001; OLIPHANT, 2002).

La flumequina, de la misma manera que las demás quinolonas inhibe la actividad de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV, enzimas que controlan la replicación y transcripción del ADN. Dado que estas enzimas se encuentran en todos los microorganismos, es de esperarse un amplio espectro de actividad antimicrobiana (COZZARELLI, 1980; SMITH, 1986a; VANCUTSEM *et al.*, 1990; SATO *et al.*, 1992;

DRLICA y KREISWIRTH, 1994; BELLIDO *et al.*, 1997; DRLICA y ZHAO, 1997; LECOEUR-BITCHATCHI y KOLF-CLAUW, 1999).

El objetivo principal de la terapéutica antimicrobiana es conseguir concentraciones de un antibiótico varias veces superiores a la CMI de los microorganismos patógenos presentes en los tejidos diana infectados. La CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) son dos índices farmacodinámicos que poseen un elevado valor orientativo en la elección de un antimicrobiano y en su dosificación en vistas a su eficacia.

La CMI, es la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de  $10^5$  bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18 a 24 horas de incubación. La CMB es la menor concentración capaz de destruir o matar  $10^5$  bacterias en 1 ml de cultivo, tras 18 a 24 horas de incubación. La CMB de las fluoroquinolonas es igual o incluso algo superior a la CMI. Así, generalmente estos compuestos presentan su actividad bactericida a concentraciones iguales o casi en el mismo orden que las concentraciones bacteriostáticas (WOLFSON y HOOPER, 1991b). Se han evaluado las variables que alteran la CMI para ver la posible interferencia con la CMB. La mayoría de las veces se observó que en la medida que se incrementaba el valor correspondiente a la CMI, se incrementaba paralelamente la CMB, incluso bajo diferentes condiciones experimentales, en las que existían variantes tales como el medio, incremento en las cepas inoculadas, cambios en pH, y en presencia de suero u orina (WOLFSON y HOOPER, 1989a). Sin embargo, en dos estudios, el incremento de las cepas inoculadas da lugar a un desproporcionado incremento en la CMB (BRYSKIER y CHANTOT, 1995). Por otra parte, tomando en consideración la velocidad de la actividad *in vitro* y la influencia de la concentración del antimicrobiano, se pueden establecer dos grandes grupos de antibióticos:

i) Los antibióticos concentración-dependiente, donde la velocidad de acción bactericida aumentará con la concentración. Estos compuestos suelen actuar rápidamente.

ii) Los antibióticos tiempo-dependiente, para los cuales el efecto bactericida está directamente relacionado con el tiempo en que se mantienen las concentraciones iguales o superiores a la CMI. La velocidad de actividad bactericida de estos antibióticos es menor que la de los antibióticos concentración-dependiente.

En este sentido las quinolonas en general se consideran antimicrobianos bactericidas concentración dependiente frente a bacterias Gram-negativas y algunas bacterias Gram-positivas (DUDLEY, 1991), aunque algunos investigadores afirman que en caso específico de bacterias Gram-positivas el comportamiento bactericida de las fluoroquinolonas es tiempo-dependiente (KECK y BORNE, 1995).

Al referirse a la potencial eficacia clínica de la flumequina, fármaco objeto del presente estudio, es muy importante relacionar los datos de sensibilidad *in vitro* con la información farmacocinética correspondiente. En efecto, los estudios farmacocinéticos (PK) y los estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* (PD) de las quinolonas permiten predecir la dosis necesaria para lograr el resultado clínico deseado, aunque se debe confirmar con estudios clínicos. Las quinolonas son antibióticos concentración-dependiente (ZHANEL, 2001), en estos casos, los parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) que mejor se relacionan con la eficacia del antibiótico son las relaciones área bajo la curva (AUC)/CMI y la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ )/CMI ya que se consigue un mayor efecto bactericida cuanto mayor es la concentración en contacto con las bacterias infectantes.

La proporción  $C_{\max}/\text{CMI}$  es particularmente importante en presencia de bacterias con CMI alta o en presencia de bacterias con una capacidad de elevada proliferación. En este último caso, las bacterias tienen una mayor probabilidad de sufrir una mutación, que podría conducir a la creación de una población bacteriana menos susceptible. En los procesos infecciosos donde hay una alta concentración bacteriana, la probabilidad de sufrir una mutación es mayor (CRAIG y DALHOFF, 1998; DRUSANO, 2002). Diversas investigaciones han demostrado que las quinolonas con una proporción  $C_{\max}/\text{CMI}_{90} > 3$  provocan una reducción en el recuento bacteriano del 99% y con una proporción  $C_{\max}/\text{CMI}_{90} \geq 10$  previenen la aparición de microorganismos resistentes (SHOJAEI y LEES, 1997). Altas concentraciones de antibiótico en relación a la CMI de los microorganismos, también contribuyen a incrementar el “efecto post antibiótico” (EPA). El EPA *in vivo* es mayor que el *in vitro* para la mayoría de los microorganismos, a excepción del *Streptococcus β hemoliticus*. Por tanto, una adecuada proporción  $C_{\max}/\text{CMI}$  será fundamental para retrasar el re-crecimiento de patógenos. El resultado de usar esta integración PK/PD es seleccionar *a priori* regímenes de dosificación adecuados, es decir conseguir una menor cantidad de microorganismos capaces de producir subpoblaciones resistentes.

Cuando no es posible una proporción de  $C_{\max}/\text{CMI} \geq 10$ , la importancia del tiempo de exposición al fármaco es mayor, y la eficacia dependerá de la proporción AUC/CMI. La proporción AUC/CMI también sirve como índice PK/PD cuando la infección está provocada por bacterias de crecimiento lento, cuando existe un EPA bajo o nulo, o cuando son bajas las CMIs de microorganismos. Gran cantidad de estudios con modelos animales (basados en infecciones causadas por Gram-negativos) han mostrado que se necesita un valor de AUC/CMI de 100-125, para asegurar la efectividad del antibiótico (CRAIG y DALHOFF, 1998). Este valor de 100 si lo trasladamos a

concentración de fármaco, equivale aproximadamente a 4 veces la CMI a lo largo de un periodo de 24 horas de dosificación; la proporción AUC/CMI para bacterias Gram-positivas es considerablemente inferior, aproximadamente 30-50. A estos parámetros se les ha denominado “cocientes inhibitorios” y se les ha relacionado con la prevención en la generación de resistencia bacteriana, puesto que un valor alto en la razón  $C_{max}/CMI$  se ha asociado con una baja incidencia de aparición de las resistencias (HYATT *et al.*, 1995).

Actualmente en la literatura científica existen escasos datos de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina frente a gérmenes patógenos aislados de diferentes animales destinados a consumo humano. En las **Tabla 2, 3, y 4** se presenta la concentración mínima inhibitoria 90% (CMI<sub>90</sub>), para la flumequina en comparación con otras fluoroquinolonas utilizadas en terapéutica veterinaria, frente a cepas de microorganismos patógenos aislados de varias especies de animales domésticos, así como frente a algunas cepas de origen humano encontrados en la literatura. En la **Tabla 5** se presenta la dosis eficaz de flumequina y otras quinolonas para el 50% (DE<sub>50</sub>) frente algunos de los principales patógenos entéricos (ROHLFING *et al.*, 1977).

#### Especies de *Pasteurella*

Las fluoroquinolonas presentan buena actividad frente algunas especies de *Pasteurella* y las CMIs son menores en comparación con otros agentes antimicrobianos. Se ha descrito en la literatura científica que frente a *P. multocida* en bovinos la flumequina tiene una CMI<sub>50</sub> de 4 µg/ml y CMI<sub>90</sub> de 8 µg/ml (ZIV *et al.*, 1986). Estos datos son comparables con los reportados posteriormente por MEVIOUS *et al.* (1990b), que se presentan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<i>Pasteurella multocida</i>	<b>Bovino</b>	<b>Flumequina</b>	<b>4</b>
	Perro y bovino	Marbofloxacina	0,008-0,5
	Porcino	Norfloxacina	0,03-0,25
	Porcino	Ciprofloxacina	0,007-0,03
	Porcino	Enrofloxacina	0,007-0,12
	Bovinos y aves	Danofloxacina	0,06-0,25
	Bovinos y cerdos	Orbifloxacina	0,025

MEVIOUS *et al.*, 1990b; SPRENG *et al.*, 1995; WALKER, 2000; DRUGEON *et al.*, 1997; HANNAN *et al.*, 1989; PRESCOTT y YIELDING, 1990; SCHEER, 1987; GILES *et al.*, 1991; RAEMDONCK *et al.*, 1992; NAKAMURA, 1995.

#### Especies de *Salmonella*

En comparación con otros agentes antimicrobianos, ROHLFING *et al.* (1977), encontraron en un estudio llevado a cabo con ratones infectados con *S. Typhimurium* cepa W118 que la actividad antibacteriana de flumequina fue comparable con la de ampicilina a dosis únicas iguales (100 mg/kg p.c./día).

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras

fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Salmonella typhimurium</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,5</b>
	Humano	Ácido nalidixico	2
	Humano	Ácido pipemidico	1 - 2
	Humano	Cinoxacina	2
	Humano	Ácido oxolínico	0,12 - 0,25
	Humano	Pefloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Acrosoxacina	0,25 - 0,5
	Humano	Amifloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Norfloxacina	0,03 - 0,06
	Humano	Enoxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Ofloxacina	0,03 - 0,03
	Humano	Ciprofloxacina	0,03 - 0,06
<b><i>Salmonella spp.</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,5 - 1</b>
	Humano	Ácido nalidixico	1 - 4
	Humano	Ácido pipemidico	1 - 2
	Humano	Cinoxacina	2 - 4
	Humano	Ácido oxolínico	0,12 - 0,25
	Humano	Pefloxacina	0,06 - 0,25
	Humano	Acrosoxacina	0,12 - 1
	Humano	Amifloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Norfloxacina	0,03 - 0,06
	Humano	Enoxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Ofloxacina	0,03 - 0,06
	Humano	Ciprofloxacina	0,008 - 0,015

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras

fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Shingella spp.</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,5 - 1</b>
	Humano	Ácido nalidixico	4 - 8
	Humano	Ácido pipemidico	1 - 4
	Humano	Cinoxacina	4 - 8
	Humano	Ácido oxolínico	0,25 - 1
	Humano	Pefloxacina	0,06 - 0,5
	Humano	Acrosoxacina	0,25 - 2
	Humano	Amifloxacina	0,06 - 0,25
	Humano	Norfloxacina	0,03 - 0,12
	Humano	Enoxacina	0,03 - 0,12
	Humano	Ofloxacina	0,03 - 0,12
	Humano	Ciprofloxacina	0,08 - 0,03
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,12 - 0,5</b>
	Humano	Ácido nalidixico	2 - 4
	Humano	Ácido pipemidico	1 - 4
	Humano	Cinoxacina	2 - 4
	Humano	Ácido oxolínico	0,12 - 0,5
	Humano	Pefloxacina	0,12 - 0,25
	Humano	Acrosoxacina	0,12 - 0,25
	Humano	Amifloxacina	0,12- 0,25
	Humano	Norfloxacina	0,06
	Humano	Enoxacina	0,12 - 0,25
	Humano	Ofloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Ciprofloxacina	0,008 - 0,015

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras

fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Vibrio cholerae</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,06 - 0,12</b>
	Humano	Ácido nalidixico	0,5 - 1
	Humano	Ácido pipemidico	0,5 - 1
	Humano	Cinoxacina	1 - 2
	Humano	Ácido oxolínico	0,03 - 0,06
	Humano	Pefloxacina	0,008
	Humano	Acrosoxacina	0,008
	Humano	Amifloxacina	0,008
	Humano	Norfloxacina	0,008 - 0,015
	Humano	Enoxacina	0,03
	Humano	Ofloxacina	0,008 - 0,015
	Humano	Ciprofloxacina	0,004 - 0,008
<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,12 - 0,25</b>
	Humano	Ácido nalidixico	0,05 - 1
	Humano	Ácido pipemidico	0,05 - 1
	Humano	Cinoxacina	1 - 2
	Humano	Ácido oxolínico	0,06 - 0,12
	Humano	Pefloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Acrosoxacina	0,03 - 0,06
	Humano	Amifloxacina	0,03 - 0,12
	Humano	Norfloxacina	0,03 - 0,06
	Humano	Enoxacina	0,06 - 0,25
	Humano	Ofloxacina	0,06 - 0,12
	Humano	Ciprofloxacina	0,15- 0,06

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> Bacterias Gram-negativas	<b>ORIGEN CEPAS</b> BACTERIANAS	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> (µg/ml)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,03 - 0,12</b>
	Humano	Ácido nalidixico	0,25 - 0,5
	Humano	Ácido pipemidico	0,25 - 0,5
	Humano	Cinoxacina	1 - 2
	Humano	Ácido oxolínico	0,015 - 0,06
	Humano	Pefloxacina	0,0153 - 0,03
	Humano	Acrosoxacina	0,03 - 0,12
	Humano	Amifloxacina	0,015 - 0,03
	Humano	Norfloxacina	0,08 - 0,06
	Humano	Enoxacina	0,015 - 0,06
	Humano	Ofloxacina	0,008 - 0,03
	Humano	Ciprofloxacina	0,008 - 0,015

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

#### Especies de *Neisseria*

La flumequina presenta una excelente actividad *in vitro* frente a cepas de *Neisseria* (FELMINGHAM *et al.*, 1985; NEU, 1989; SUH y LORBER, 1995); como *N. meningitidis* con una CMI para el 50% y el 90% de 0,12 µg/ml, actividad comparable a la del ácido oxolínico (0,06-0,12 µg/ml) (FELMINGHAM *et al.*, 1985).

**Continuación Tabla 2.** Actividad *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,12 - 2</b>
	Humano	Ácido nalidixico	0,5 - 8
	Humano	Ácido pipemidico	2 - 16
	Humano	Cinoxacina	2 - 16
	Humano	Ácido oxolínico	0,5 - 2
	Humano	Pefloxacina	0,06 - 0,5
	Humano	Acrosoxacina	0,03 - 1
	Humano	Amifloxacina	0,12- 1
	Humano	Norfloxacina	0,06 - 0,5
	Humano	Enoxacina	0,12- 1
	Humano	Ofloxacina	0,003 - 0,5
	Humano	Ciprofloxacina	0,03 - 0,5
<i>Neisseria meningitidis</i>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,06 - 0,12</b>
	Humano	Ácido nalidixico	0,5 - 1
	Humano	Ácido pipemidico	0,5 - 1
	Humano	Cinoxacina	2
	Humano	Ácido oxolínico	0,06 - 0,12
	Humano	Pefloxacina	0,03
	Humano	Acrosoxacina	0,015 - 0,06
	Humano	Amifloxacina	0,015 - 0,03
	Humano	Norfloxacina	0,015 - 0,03
	Humano	Enoxacina	0,015 - 0,03
	Humano	Ofloxacina	0,015
	Humano	Ciprofloxacina	0,004 - 0,008

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

### Especies de *Bacteroides*

Diferentes cepas de *Bacteroides* son sensibles a la actividad *in vitro* de las quinolonas, aunque existe una variación dependiente del compuesto y de la especie, así la flumequina tiene una CMI de 64 µg/ml para especies como *B. fragilis*, *B. melaninogenicus*, y *B. bivius*. En el caso de *B. fragilis* y *B. bivius* la CMI de flumequina es igual para el ácido oxolínico, e inferior que para ácido nalidixico, ácido pipemidico y cinoxacian (>128-128 µg/ml). Respecto a *B. melaninogenicus* la CMI de flumequina es menor que la de ácido nalidixico, ácido pipemidico y cinoxacina. Para estas tres especies *Bacteroides* las CMI de flumequina son superiores en comparación con otros compuestos como pefloxacina, norfloxacina o ciprofloxacina (FELMINGHAM *et al.*, 1985).

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Bacteroides melaninogenicus</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>32 - 128</b>
	Humano	Ácido nalidixico	>128
	Humano	Ácido pipemidico	64 - >128
	Humano	Cinoxacina	>128
	Humano	Ácido oxolínico	8 - 32
	Humano	Pefloxacina	2 - 8
	Humano	Acrosoxacina	4 - 16
	Humano	Amifloxacina	8 - 32
	Humano	Norfloxacina	1 - 8
	Humano	Enoxacina	4 - 8
	Humano	Ofloxacina	0,5 - 2
	Humano	Ciprofloxacina	0,5 - 2

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-negativas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Bacteroides bivius</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>32- 64</b>
	Humano	Ácido nalidixico	128 - >128
	Humano	Ácido pipemidico	128 - >128
	Humano	Cinoxacina	>128
	Humano	Ácido oxolínico	32 - 64
	Humano	Pefloxacina	16 - 32
	Humano	Acrosoxacina	16 - 32
	Humano	Amifloxacina	64 - 128
	Humano	Norfloxacina	64 - 128
	Humano	Enoxacina	32 - 64
	Humano	Ofloxacina	8 - 32
	Humano	Ciprofloxacina	8 - 16

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

#### Especies de *Staphylococcus*

Generalmente las cepas de *Staphylococcus* son sensibles a la acción de las fluoroquinolonas (FELMINGHAM *et al.*, 1985; NEU, 1989; BELLIDO *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 1997; ELIOPOULOS, 1999; TAKEI *et al.*, 2001); como en el caso de *S. aureus* que para flumequina tiene una CMI<sub>50</sub> de 1 µg/ml y una CMI<sub>90</sub> de 2 µg/ml; para *Staphylococcus* spp. 2 µg/ml corresponden a valores a ambas CMI. Estas concentraciones son comparables con las de otros compuestos como pefloxacina, amifloxacina o norfloxacina, y que son por mucho, inferiores a las CMIs de compuestos como el ácido nalidixico, ácido pipemidico, ácido oxolínico y cinoxacin (FELMINGHAM *et al.*, 1985).

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-positivas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>Humanos</b>	<b>Flumequina</b>	<b>0,5-4</b>
	Perros	Marbofloxacin	0,25-0,4
	Varias especies	Norfloxacin	1,0
	Varias especies	Enrofloxacin	0,13-0,4
	Varias especies	Ciprofloxacin	0,5-1,0
	Varias especies	Danofloxacin	0,13-0,2
	Humano	Pefloxacin	0,25-1
	Humano	Ofloxacin	0,12-0,5
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>1-4</b>
	Perro	Marbofloxacin	≤0,2-0,25
	Perro	Norfloxacin	0,156-1,25
	Perro	Ciprofloxacin	0,25
	Perro	Enrofloxacin	0,12-0,5
	Varias especies	Danofloxacin	0,13
	Perro	Orbifloxacin	0,39-0,5
	Perro	Difloxacin	0,91-1,0
	Humano	Pefloxacin	0,25-1
	Humano	Ofloxacin	0,25-1
	Humano	Ácido nalidixico	16-64

FELMINGHAM *et al.*, 1985; SCHEER, 1987; WALKER *et al.*, 1989; PRESCOTT y BAGGOT, 1993; SPRENG *et al.*, 1995; CESTER *et al.*, 1996; WATTS *et al.*, 1997; IHRKE *et al.*, 1999; WALKER, 2000.

#### Especies de *Streptococcus*

Las fluoroquinolonas no presentan buena actividad frente a cepas de *Streptococcus* tales como *S. Pneumoniae*, *S. faecalis* y *S. agalactiae* (FELMINGHAM *et al.*, 1985; ELIOPOULOS, 1999; TAKEI *et al.*, 2001), aunque la CMI de flumequina

es inferior que los valores de CMI de compuestos tales como ácido nalidixico, ácido oxolínico, ácido pipemidico y cinoxacina.

**Continuación Tabla 2.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-positivas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<b><i>Streptococcus spp</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>16-64</b>
	Perros y gatos	Marbofloxacina	0,91-3,8
	Varias especies	Norfloxacina	4,0-8,0
	Varias especies	Ciprofloxacina	1,0
	Varias especies	Enrofloxacina	1,0
	Humano	Pefloxacina	4-16
	Humano	Ofloxacina	0,5-2
	Humano	Ácido nalidixico	>512
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>8-64</b>
	Humano	Enoxacina	4-32
	Humano	Norfloxacina	2-32
	Humano	Ciprofloxacina	0,5-4
	Humano	Amifloxacina	8-32
	Humano	Pefloxacina	4-32
	Humano	Ofloxacina	1-4
	Humano	Ácido nalidixico	128-<128

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

#### Especies de *Clostridium*

En general, las especies de *Clostridium* son sensibles a flumequina, pero esta sensibilidad es variable en cada especie, siendo más sensible para *C. welchii* que para *C. difficile*.

**Continuación Tabla 2.** Actividad *in vitro* de la flumequina y otras fluoroquinolonas, frente a cepas de microorganismos patógenos.

<b>MICROORGANISMO</b> <b>Bacterias Gram-positivas</b>	<b>ORIGEN CEPAS</b> <b>BACTERIANAS</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>RANGO CMI<sub>90</sub></b> <b>(µg/ml)</b>
<i>Clostridium difficile</i>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	64 - 128
	Humano	Ácido nalidixico	>128
	Humano	Ácido pipemidico	>128
	Humano	Cinoxacina	>128
	Humano	Ácido oxolínico	64 - 128
	Humano	Pefloxacina	32 - 64
	Humano	Amifloxacina	64 - 128
	Humano	Norfloxacina	32 - 128
	Humano	Enoxacina	64 - 128
	Humano	Ofloxacina	4 - 16
	Humano	Ciprofloxacina	4 - 16
<i>Clostridium welchii</i>	<b>Humano</b>	<b>Flumequina</b>	<b>4 - 8</b>
	Humano	Ácido nalidixico	4 - 32
	Humano	Ácido pipemidico	16 - 32
	Humano	Cinoxacina	8 - 32
	Humano	Ácido oxolínico	2 - 4
	Humano	Pefloxacina	0,25 - 1
	Humano	Amifloxacina	1 - 2
	Humano	Norfloxacina	0,5 - 2
	Humano	Enoxacina	1 - 4
	Humano	Ofloxacina	0,5 - 1
	Humano	Ciprofloxacina	0,12 - 1

FELMINGHAM *et al.*, 1985.

**Tabla 3.** CMI de flumequina y otros agentes antimicrobianos frente a *Pasteurella multocida* y *Pasteurella hemolítica* en bovinos.

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>CMI<sub>50</sub> µg/ml</b>	<b>CMI<sub>90</sub> µg/ml</b>
<b><i>Pasteurella multocida</i></b>		
<b>Flumequina</b>	<b>0,25</b>	<b>4</b>
Enrofloxacina	≤0,004	0,06
Ciprofloxacina	0,008	0,06
Kanamicina	8	≥16
Neomicina	8	≥16
Estreptomicina	≥16	≥16
Gentamicina	2	2
Ampicilina*	≤0,03	0,25
Cephalothin	0,06	0,12
Oxitetraciclina	≥16	≥16
Doxiciclina	2	4
Minociclina	0,5	0,5
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,015/0,3	8/160
Trimetoprim	0,06	4
Aditoprim	0,25	8
Cloranfenicol	2	≥16
Espiramicina	≥16	≥16
Tilosina	≥16	≥16

MEVIOUS *et al.*, 1990b.

**Continuación Tabla 3.** CMI de flumequina y otros agentes antimicrobianos frente a *Pasteurella multocida* y *Pasteurella hemolítica* en bovinos.

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>CMI<sub>50</sub> µg/ml</b>	<b>CMI<sub>90</sub> µg/ml</b>
<b><i>Pasteurella hemolítica</i></b>		
<b>Flumequina</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
Enrofloxacina	0,03	0,25
Ciprofloxacina	0,008	0,03
Kanamicina	8	≥16
Neomicina	4	8
Estreptomicina	≥16	≥16
Gentamicina	1	2
Ampicilina	8	≥16
Cephalothin	2	2
Oxitetraciclina	≥16	≥16
Doxiciclina	8	8
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,5/10	4/80
Aditoprim	4	≥16
Cloranfenicol	0,25	4
Espiramicina	≥16	≥16
Tilosina	≥16	≥16

MEVIOUS *et al.*, 1990b

**Tabla 4.** CMI de flumequina, enrofloxacin y ciprofloxacina frente a *Salmonella dublín*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

Agente antibacteriano	CMI <sub>50</sub> µg/ml	CMI <sub>90</sub> µg/ml
<i>Salmonella Dublín</i>		
<b>Flumequina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
Enrofloxacin	0,03	0,03
Ciprofloxacina	≤0,004	0,008
<i>Salmonella typhimurium</i>		
<b>Flumequina</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
Enrofloxacin	0,03	0,03
Ciprofloxacina	0,008	0,008
<i>Escherichia coli</i>		
<b>Flumequina</b>	<b>0,5</b>	<b>4</b>
Enrofloxacin	0,015	0,12
Ciprofloxacina	0,008	0,06

MEVIOUS *et al.*, 1990b.

**Tabla 5.** Dosis eficaz para el 50% (DE<sub>50</sub>) de flumequina, ácido nalidixico y ácido oxolínico frente a patógenos entéricos.

Microorganismo	DE <sub>50</sub> mg/kg		
	Flumequina	Ácido nalidixico	Ácido oxolínico
<i>Proteus vulgaris</i>	14	18	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	11	5
<i>Escherichia coli</i>	225	>250	>250
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	>250	32

ROHLFING *et al.*, 1977.

Respecto a las enfermedades infecciosas causadas por bacterias en especies de peces marinos, la **Tabla 6** recoge los principales agentes patógenos implicados (TORANZO *et al.*, 2005). Es importante apuntar que las enfermedades más típicas en acuicultura marina son la furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), la enfermedad renal bacteriana (BKD) (*Renibacterium salmoninarum*), la enfermedad crónica de salmónidos, la flexibacteriosis (*Flexibacter marinus* y *F. maritimus*) y algunos tipos de estreptococosis que inducen enfermedades complejas con alteraciones en el SNC, entre otras. Los signos clínicos (externos e internos) originados por cada patógeno dependen de la especie, edad y estado de la enfermedad (agudo, crónico).

Los agentes patógenos descritos (ver **Tabla 6**) generalmente pueden estar presentes también en poblaciones de peces salvajes, sin embargo en un medio natural estos patógenos raramente causan mortalidad principalmente debida a las condiciones de estrés que generalmente soportan los peces en acuicultura.

Aunque un gran número de quinolonas son útiles para el tratamiento de infecciones en peces, el ácido oxolínico y la flumequina son las más importantes y las que más se usan y se vienen estudiando en acuicultura. Debido a sus bajas CMI para los principales y más susceptibles patógenos de peces y por su eficaz distribución sistémica en peces cuando se administran oralmente en los piensos medicados, las quinolonas se utilizan ampliamente para el tratamiento de infecciones sistémicas bacterianas (AUSTIN *et al.*, 1983 ; CHEVALIER *et al.*, 1981 ; HUSTVEDT *et al.*, 1992 ; RODGERS y AUSTIN, 1983 ; SAMUELSEN y BERGH, 2004). Son eficaces frente a infecciones bacterianas comunes tales como furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), furunculosis atípicas (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*), vibriosis clásica (*Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*), vibriosis de agua fría (*Vibrio salmonicida*) y yersiniosis (*Yersinia ruckeri*).

**Tabla 6.-** Patógenos implicados en enfermedades bacterianas en peces de importancia económica en acuicultura.

<b>PATOGENO BACTERIANO</b>	<b>ENFERMEDAD</b>	<b>HOSPEDADOR MARINO PRINCIPAL</b>	<b>DISPONIBILIDAD DE VACUNA</b>
Gram negativo			
<i>Vibrio anguillarum</i>	Vibriosis	Salmónidos, rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ), lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), lubina estriada ( <i>Morone saxatilis</i> ), anguila ( <i>Anguilla anguilla</i> ), ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> ), bacalao ( <i>Gadus morhua</i> ), dorada de Japón ( <i>Pragus major</i> )	+
<i>Vibrio ordalii</i>	Vibriosis	Salmónidos	+
<i>Vibrio salmonicida</i>	Vibriosis	Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ), bacalao ( <i>Gadus morhua</i> )	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibriosis	Anguila ( <i>Anguilla anguilla</i> )	+
<i>Vibrio viscosus</i>	Úlcera de invierno	Salmón de Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )	+
<i>Pasteurella piscicida</i>	Pasteurelosis	Dorada ( <i>Gilthead seabream</i> ), lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), lenguado ( <i>Solea solea</i> ), lubina estriada ( <i>Morone saxatilis</i> ), medregal de Japón ( <i>Seriola quinqueradiata</i> )	+
<i>Pasteurella skyensis</i>	Pasteurelosis	Salmón de Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Forunculosis	Salmónidos, rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	(+) <sup>a</sup>
<i>Flexibacter maritimus</i>	Flexibacteriosis	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ), salmónidos, lenguado ( <i>Solea solea</i> ), lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), dorada ( <i>Gilthead seabream</i> ), dorada de Japón ( <i>Pragus major</i> ), halibut de Japón ( <i>Paralichtys olivaceus</i> )	+
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Pseudomonadiosis “enfermedad del invierno”	Dorada ( <i>Gilthead seabream</i> ), anguila ( <i>Anguilla anguilla</i> ), rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ), ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )	(+) <sup>b</sup>

**Continuación Tabla 6.** Patógenos implicados en enfermedades bacterianas en peces de importancia económica en acuicultura.

<b>PATOGENO BACTERIANO</b>	<b>ENFERMEDAD</b>	<b>HOSPEDADOR MARINO PRINCIPAL</b>	<b>DISPONIBILIDAD DE VACUNA</b>
Gram positivo			
<i>Enterococcus seriolicida</i>	Estreptococosis o lactococosis	Medregal de Japón ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ), anguila ( <i>Anguilla anguilla</i> )	(+) <sup>c</sup>
<i>Streptococcus iniae</i>	Estreptococosis	Medregal de Japón ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ), halibut de Japón ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ), lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), perca gigante ( <i>Latex calcarifer</i> )	(+) <sup>c</sup>
<i>Streptococcus parauberis</i>	Estreptococosis	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	+
<i>Streptococcus phocae</i>	Estreptococosis	Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )	-
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Enfermedad renal bacteriana (BKD)	Salmónidos	+
<i>Mycobacterium marinum</i>	Mycobacteriosis	Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ), salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )	-
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Piscirickettsiosis	Salmónidos	(+) <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Protección limitada en rodaballo

<sup>b</sup>En desarrollo

TORANZO *et al.*, 2005

<sup>c</sup>Alta protección. Duración depende del hospedador

<sup>d</sup>Dudosa eficacia en condiciones de campo

En acuicultura, la resistencia a las quinolonas empieza a ser un problema sobre todo en aquellas áreas en las que el uso de estos fármacos es amplio y sin una elección de dosis adecuada, pero afortunadamente no existen indicaciones de haberse desarrollado una resistencia bacteriana mediada por plásmidos.

El control de patógenos bacterianos en acuicultura sigue siendo de gran interés por la considerable pérdida económica que conllevan. Por ello los fármacos

antibacterianos son de gran importancia considerando además que por el momento no se han desarrollado vacunas muy eficaces frente a infecciones sistémicas bacterianas en peces.

Como se ha mencionado anteriormente, la evaluación de la eficacia de un agente antibacteriano se basa en su actividad frente a patógenos bacterianos lo que se evalúa como la CMI complementada con la medida de los niveles plasmáticos en las especies diana. Aunque los valores de CMI reflejan una medida laboratorial cuantitativa de la sensibilidad bacteriana frente a fármacos ensayados sin preveer un cuadro completo de la situación *in vivo*, se ha demostrado que la CMI es una medida válida para predecir la eficacia de un tratamiento a partir de datos *in vitro* (BRUUN *et al.*, 2003).

En acuicultura, para el estudio de patologías producidas por bacterias se deben tener en cuenta distintos parámetros a analizar como el propio pez (especie, estado fisiológico y edad), el microorganismo patógeno, las condiciones ambientales (fluctuaciones en el nivel de oxígeno, salinidad, temperatura, etc.) y los factores inherentes al manejo del pez (alta densidad de población, limpieza de tanques, clasificación de peces, etc.), para así estudiar correctamente la susceptibilidad del pez a contraer la enfermedad. En muchos casos la patología se produce debido a aquellos microorganismos habituales del aparato digestivo de los peces que se hacen patógenos debido a situaciones de estrés de tipo ambiental o alimentario. En otros muchos casos la causa de la patología son agentes etiológicos primarios cuya virulencia o capacidad de reproducción se ven alterados por cambios y alteraciones en factores ecológicos o biológicos. En muchos casos, las irritaciones en la piel y mucosas del animal debido a contaminantes o tratamientos preventivos y otras lesiones cutáneas pueden favorecer la penetración de bacterias. La sintomatología de las enfermedades bacterianas se relaciona frecuentemente con alteraciones en la natación, peso, hidropesía, respuesta

inflamatoria y hemorragias internas o externas que pueden producir o no necrosis. Las principales infecciones bacterianas que afectan a los peces son aquellas producidas por las bacterias de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia* y *Renibacterium*. *Mycobacterium marinum* que produce la tuberculosis.

Las bacterias más importantes que producen enfermedades en acuicultura con especial interés en Europa son:

-Gram-positivas: *Renibacterium salmoninarum* y *Streptococcus/Lactococcus*.

-Gram-negativas: *Aeromonas* (*A. salmonicida* y *A. hydrophila* principalmente); especies de *Vibrio* (*Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*); *Yersinia ruckeri*; *Edwardsiella tarda/ictaluri/septicemia*; *Pseudomonas* spp; *Pasteurella Piscicida*; *Flavobacterium/Flexibacter*; *Piscirickettsia salmonis*; *Chlamydia* y *Rickettsia*.

Los principales patógenos bacterianos que se encuentran en el pez dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) incluyen *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *Aeromonas* spp, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella ictaluri*, *Pseudomonas* spp, *Chondrococcus* spp, (*Cytophagaceae*) y *Mycobacterium marinum*. Aunque se han identificado pocas rickettsias y clamidias patógenas, sí es importante mencionar la epitelocistis en dorada producida por estas especies bacterianas de estos géneros (BROWN, 2000; RIGOS y TROISI, 2005; ORTEGA, 2008).

*Vibrio alginolyticus* es la especie que produce la más alta mortalidad en dorada (*Sparus aurata*) en acuicultura. La enfermedad puede manifestarse por sí misma como una septicemia hemorrágica ulcerativa y es el manejo el factor primario en la etiología

de la septicemia aguda en condiciones de agua caliente (19-24°C). A temperaturas más bajas las infecciones sistémicas o crónicas crean unas condiciones no deseables para el crecimiento del animal. Estas infecciones crónicas producen en el pez inactividad, letargia, oscurecimiento del color y pérdida de escamas; las lesiones cutáneas forman rápidamente úlceras en la piel y las hemorragias dérmicas pueden identificarse fácilmente entre las escamas de la cabeza.

Infecciones por *Aeromonas* y *Pseudomonas* producen a nivel dérmico y subdérmico úlceras profundas en la región interorbital de las doradas maduras.

El pez dorada también es muy susceptible a padecer infección por *Mycobacterium*, siendo una infección externa que afecta principalmente a la piel y las branquias. La infección se suele dar a baja temperatura del agua (12-17 °C) y suele verse favorecida en casos de estrés del animal, debido a cambios ambientales o estrés producido por manipulación. También es importante señalar la *enfermedad del invierno* enfermedad sólo estudiada en dorada, debida a una asociación de *Mycobacterium* y *Pseudomonas*.

En la literaturacientífica existen escasos datos de valores de CMI de quinolonas en acuicultura. La **Tabla 7** presenta CMI descritas para la flumequina, antimicrobiano objeto de nuestro estudio, frente a patógenos importantes en acuicultura en el área mediterránea.

El uso de fármacos antibacterianos en acuicultura está limitado a un tratamiento oral. Los tratamientos por vía parenteral en peces es muy limitado y generalmente restringido a peces ornamentales. El tratamiento en forma de baño aunque es fácil de llevar a cabo con fármacos de alta solubilidad en agua también está limitado por los sistemas de recirculación de los tanques, y solo se realiza en especies de peces de

dimensiones pequeñas que sufren infecciones sistémicas en la piel y en las agallas; en este caso es importante tener en cuenta la presencia de ciertos cationes en el agua del mar que pueden complejar ciertas quinolonas y reducirse por ello su absorción (SAMUELSEN y LUNESTAD, 1996).

La administración oral es el tratamiento más común para la mayoría de las especies de peces adultos, sin embargo se debe tener en cuenta que el tratamiento es en masa, es decir, de todo el grupo de peces, más que un tratamiento individual, por lo que parece que es un tratamiento más bien profiláctico que terapéutico. El fármaco antibacteriano se administra en forma de alimento medicado, o pellets incorporados o mezclados con los ingredientes del alimento. Lo más importante es elegir un régimen terapéutico que maximice la eficacia y minimice el riesgo de desarrollo de patógenos resistentes, a este respecto el estudio de la farmacocinética del fármaco es imprescindible junto con el conocimiento de los valores de CMI frente al patógeno infectante.

La utilización de piensos medicados está indicada para tratamiento de infecciones bacterianas, incluso aquellas infecciones secundarias. El tratamiento debe administrarse sólo cuando haya una alta probabilidad de infección bacteriana y tan rápido como sea posible, así como en la dosis correcta durante el periodo de tiempo adecuado para asegurarnos las concentraciones tisulares adecuadas. Además, conveniente realizar rotaciones de antibióticos a utilizar. A la hora de aplicar un tratamiento a través del pienso es interesante tener en cuenta la posible disminución del apetito (ingesta de alimento) del animal debido a la infección, por ello se deben calcular cantidades muy pequeñas de pienso medicado a administrar. El pez dorado suele comer diariamente una cantidad de pienso equivalente al 10% de su peso, es decir, una dorada de 200 g ingiere diariamente unos 20 g de pienso. En el caso de administrar un pienso

medicado, la cantidad ideal establecida a administrar es el 1% del peso del animal. Si se quiere administrar una cantidad mayor de pienso, sería recomendable administrar el 1% de pienso medicado y el resto de pienso sin medicar (BROWN, 2000).

**Tabla 7.** Valores de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) de flumequina frente a patógenos bacterianos comunes en acuicultura.

<b>PATOGENO BACTERIANO</b>	<b>QUINOLONA</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>) (usando agua destilada con NaCl al 2%) (22°C)</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>) (adición de <math>\text{Ca}^{2+}</math> 10mM y <math>\text{Mg}^{2+}</math> 55mM) (22°C)</b>
<i>Vibrio anguillarum</i>	<b>Flumequina<sup>a</sup></b>	0,15	4,78
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>piscida</i>		0,3	>38.25
<i>V. alginolyticus</i>		1,2	38,25
<i>V. damsela</i>		0,019	0,15
<i>V. fluvialis</i>		0,15	4,78
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<b>Flumequina<sup>b</sup></b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
		0,02 -0,1 (15°C)	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<b>Flumequina<sup>c,d</sup></b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
		0,063 (15°C); 0,18 (4°C)	
<i>V. anguillarum</i>		cepas susceptibles: <0,1 ; cepas resistentes: <1,28 (4°C); 1,71 (15°C)	
<i>Yersinia ruckeri</i>		cepas susceptibles: <0,1 ; cepas resistentes: <1,28 (4°C); 1,71 (15°C)	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<b>Flumequina<sup>e</sup></b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
		cepas susceptibles: MIC <sub>50</sub> : 0,075; CMI <sub>90</sub> : 0,10 rango: 0,075-0,10 cepas resistentes: MIC <sub>50</sub> : 2,0; CMI <sub>90</sub> : 4,0 rango: 0,10-20,0	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<b>Flumequina<sup>f</sup></b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
		< 0,075	
<i>V. anguillarum</i>		<0,075 to 0,3	
<i>Yersinia ruckeri</i>		0,075 to 0,3	

<sup>a</sup>RIGOS *et al.*, 2003; <sup>b</sup>HOIE *et al.*, 1994; <sup>c</sup>MARTISEN *et al.*, 1992 ;

<sup>d</sup>BARNES *et al.*, 1990 ; <sup>e</sup>BARNES *et al.*, 1991 ; <sup>f</sup>LEDO *et al.*, 1987.

#### 1.4. Farmacocinética

La flumequina, al igual que las demás quinolonas presenta ciertas características farmacocinéticas (**Tabla 8**); de las cuáles podemos destacar por su importancia, una rápida absorción tras su administración oral o parenteral, buena distribución tisular con altos niveles intersticiales, buena capacidad de penetración en las células fagocíticas y concentraciones urinarias muy eficaces (WISE *et al.*, 1986; SÖRGEL y KINZIG, 1993a,b; BROWN, 1996).

**Tabla 8.** Características farmacocinéticas de las quinolonas.

Buena absorción oral (excepto en rumiantes y caballos).
Absorción parenteral completa.
Buena distribución tisular.
Volumen de distribución de 2-4 L/kg.
Excreción renal (posiblemente por secreción tubular).
Metabolismo hepático por oxidación y glucoronidación.
Posible ciclo enterohepático.
Fase terminal de vida media de 2 a 4 horas.

BROWN, 1996.

Los estudios realizados sobre la relación estructura-actividad de estos antimicrobianos, por la introducción de un átomo de fluor en la posición C<sub>6</sub> y otros cambios en las posiciones C<sub>1</sub> y C<sub>7</sub> de anillo quinoleínico ha propiciado avances mediante los cuáles ha sido posible mejorar sus características farmacocinéticas, prolongando la semivida de eliminación y mejorado su penetración tisular, lo que permite que en algunos casos sea suficiente la administración de una sola dosis diaria para mantener niveles plasmáticos y tisulares de utilidad terapéutica.

Tras su administración oral, las quinolonas alcanzan altos niveles en el tracto genitourinario, tracto respiratorio y tejido óseo, por lo que estos compuestos son muy útiles

desde el punto de vista clínico en el tratamiento de estados patológicos infecciosos de estos tejidos (LODE *et al.*, 1989; ANDRIOLE, 1998; DALHOFF, 1998).

### Absorción

En general, las quinolonas presentan buena absorción (BLASER y LUTHY, 1988; VANCUTSEM *et al.*, 1990; ANADÓN, 1992; SÖRGEL y KINZIG, 1993a; SHARMA *et al.*, 1994; BROWN, 1996; HOOPER, 1998; BLONDEAU, 1999; WALKER, 2000). Cuando se administran por vía parenteral, hay una biodisponibilidad del 100% en todos los compuestos de este grupo de antibacterianos; de igual manera, la mayoría de estos fármacos presentan una buena biodisponibilidad por vía oral (>95%), que sin embargo es limitada en rumiantes y equinos debido a las características fisiológicas del tracto gastrointestinal que presentan ambas especies (LODE *et al.*, 1989; NEUMAN, 1988; VANCUTSEM *et al.*, 1990; DUDLEY, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991b; ANADÓN, 1992; BROWN, 1996; WALKER, 2000).

La presencia de cationes divalentes y alimento en el tracto gastrointestinal disminuye considerablemente la absorción de las quinolonas en todas las especies animales y en el hombre (LODE *et al.*, 1989; NEUMAN, 1988; DUDLEY, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991b; ANADÓN, 1992; BROWN, 1996; WALKER, 2000). Se han realizado ensayos *in vitro* mediante los cuales se ha determinado que la presencia de los cationes divalentes calcio y magnesio interfieren con la acumulación y actividad de las quinolonas, disminuyendo su actividad como resultado de la quelación con estos iones o con un lipopolisacárido asociado a los iones de magnesio. A consecuencia de esta interferencia, se forma un complejo, que debido a su tamaño no puede ingresar en la bacteria a través de las porinas de la pared, acción que resulta determinante para que disminuya la concentración del fármaco en el interior de la bacteria y por lo tanto, disminuya la inhibición del ADN y se incremente la CMI

(NEUMAN, 1988; LODE *et al.*, 1989; MARSHALL y PIDDOCK, 1994; WALKER, 2000).

### Distribución

La penetración de los agentes antimicrobianos al interior del espacio extravascular, incluyendo los tejidos corporales, es dependiente de diversos factores tales como la unión a proteínas, la liposolubilidad, el estado de ionización, el transporte activo, la difusión pasiva, el espacio extravascular, y el grado de respuesta inflamatoria (NEUMAN, 1988; GERDING y HITT, 1989; ANADÓN, 1992).

Las quinolonas son generalmente moléculas pequeñas, liposolubles que muestran un grado de unión a proteínas plasmáticas relativamente bajo, en un rango entre 10 y 40%, aunque algunos compuestos como la trovafloxacin pueden unirse a las proteínas en una proporción del 70% (DRUSANO *et al.*, 1986; GERDING y HITT, 1989; NEU, 1989; FILLASTRE *et al.*, 1990; VANCUTSEM *et al.*, 1990; VERGIN y METZ, 1991; ANADÓN, 1992; FITTON, 1992; HOOPER, 1998; WALKER, 2000). A este respecto, se considera como responsables de la unión a las proteínas, a los radicales situados en las posiciones 7 y 8 del anillo de la quinolona (ZLOTOS *et al.*, 1998). La flumequina presenta una unión a proteínas plasmáticas del 70% (NEUMAN, 1988).

Las quinolonas difunden pasivamente a los tejidos, por lo que es particularmente buena la penetración en los tejidos y en los compartimentos secretores y excretorios de fluido extravascular, especialmente en riñones, pulmones, próstata, epitelio bronquial, mucosa nasal, saliva, lágrimas y secreciones bronquiales, y baja en sistema nervioso central. Cuando se administran por vía oral, los picos de las concentraciones urinarias exceden a los picos de concentración plasmática, consecuentemente a esto, también sobrepasan las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para la mayoría de los

patógenos urinarios (NIX y SCHENTAG, 1988; LODE *et al.*, 1989; NEU, 1989; WISE, 1991; SHARMA *et al.*, 1994; HOOPER, 1998; WALKER, 2000); de este modo, se incrementa la eficacia de estos compuestos en el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Las quinolonas también penetran a través de la barrera placentaria y se concentran en el líquido amniótico; de igual manera difunden a la leche, donde se han detectado niveles de hasta el 75% en relación con los niveles plasmáticos (SHARMA *et al.*, 1994).

Aunque la relación entre las concentraciones de un fármaco antimicrobiano en las secreciones respiratorias y su eficacia clínica no está del todo clara, la penetración de un fármaco en las secreciones bronquiales es un factor importante para el tratamiento eficaz de infecciones respiratorias. La penetración de las quinolonas en las secreciones bronquiales, evaluadas a través del área bajo la curva (AUC) o el porcentaje de concentración frente a plasma, no difiere significativamente entre los compuestos del grupo (DAVIES *et al.*, 1986; NEUMAN, 1988; WISE, 1991; SHARMA *et al.*, 1994), y se encuentran en un rango de 53-112% (WISE, 1991). La penetración de las quinolonas en el tejido pulmonar es buena, por lo que se presentan concentraciones elevadas del fármaco, sin importar la vía por la que se administran (GERDING y HITT, 1989; SÖRGEL *et al.*, 1989; WISE, 1991; ANADÓN, 1992). Se ha demostrado que compuestos como ciprofloxacina y temafloxacina alcanzan concentraciones en tejido pulmonar  $\geq 1,5$  veces las alcanzadas en el suero (WISE *et al.*, 1991).

La liposolubilidad de las quinolonas es mayor a pH neutro (GRUBBER *et al.*, 1988; WOLFSON Y HOOPER, 1989a). Este hecho sugiere que el pH sanguíneo de 7,4 favorece el paso de estos compuestos a través de las membranas capilares. La dependencia del pH que tiene la liposolubilidad de estos compuestos también puede originar un atrapamiento iónico del fármaco en los fluidos biológicos y en los tejidos

donde existen valores de pH ligeramente ácidos; la molécula de quinolona estaría más ionizada en estos compartimientos, lo que reduciría el retorno de la molécula hacia el plasma. Este hecho podría dar lugar a niveles tisulares y en fluidos corporales más altos que los alcanzados en el plasma. La baja unión a proteínas, la alta lipofilidad al pH sanguíneo y el relativamente pequeño tamaño molecular, que en general presentan las quinolonas son factores determinantes para su amplia distribución en los tejidos y fluidos corporales.

En razón de su liposolubilidad las quinolonas atraviesan la barrera placentaria, hematoencefálica y ocular. Igualmente pueden concentrarse en las células fagocitarias tales como macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares y neutrofilos; incrementando de alguna manera la labor de estas células frente a gérmenes intracelulares. La capacidad de estos compuestos para penetrar en las células fagocitarias es un factor de considerable importancia, ya que interfiere en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos que se multiplican en el interior de la célula (CARLIER *et al.*, 1990; WISE, 1991; ANADÓN, 1992; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; SHARMA *et al.*, 1994).

En este sentido, se considera que la penetración de las quinolonas a todas las categorías de lugares extravasculares (espacios de gran volumen, fluidos secretorios, líquidos con barreras, y tejidos), es relativamente alta en comparación con otras categorías de antimicrobianos, particularmente las cefalosporinas, penicilinas y aminoglicósidos.

La flumequina posee una rápida y extensiva distribución tisular a través de los compartimientos intracelulares y extracelulares, debido a lo cual el volumen de distribución es alto (>1l/kg), característica que comparte con las otras fluoroquinolonas

(GERDING y HITT, 1989; NEU, 1989; VANCUTSEM *et al.*, 1990; VERGIN y METZ, 1991; ANADÓN, 1992; FITTON, 1992; HOOPER, 1998).

### Metabolismo

El metabolismo de las quinolonas afecta en menor grado al aclaramiento corporal de estos compuestos, alrededor del 20% del compuesto inalterado se elimina por conversión a metabolitos de menor actividad antibacteriana (HOOPER y WOLFSON, 1991; FITTON, 1992), a excepción de algunas fluoroquinolonas tales como pefloxacina, que experimenta un metabolismo amplio en la norfloxacin, y otros metabolitos de considerable actividad (GONZÁLEZ y HENWOOD, 1989; LODE *et al.*, 1989) y enrofloxacin que se metaboliza a ciprofloxacina (VANCUTSEM *et al.*, 1990). El principal lugar diana para el metabolismo de las fluoroquinolonas es el grupo 3-carboxyl y el anillo piperazina. Las fluoroquinolonas N-metiladas se biotransforman en el anillo piperazina (C<sub>7</sub>) y se originan N-oxido- y N-demetil-metabolitos. En el caso de las fluoroquinolonas no-metiladas, la biotransformación del anillo piperazina resulta en la formación de oxo-metabolitos y 2-aminoetilamino-metabolitos (VANCUTSEM *et al.*, 1990; VERGIN y METZ, 1991; FITTON, 1992; BROWN, 1996).

En general en lo que respecta a la Fase I del metabolismo, se desarrolla a través de la hidroxilación y oxidación de las fluoroquinolonas a oxoquinolonas. Los pasos implicados en el metabolismo de los sustituyentes en posición 7 son: rotura del anillo con o sin la subsiguiente oxidación o acetilación del grupo amino primario, o glucuroconjugación del grupo carboxilo. Otras transformaciones metabólicas son las fases oxidativas (oxo-metabolitos, N-oxidación), la demetilación (con o sin subsiguiente rotura del anillo) y la sulfoconjugación en la posición 4-nitrógeno del anillo de piperazina (LODE *et al.*, 1989; SÖRGEL, 1989).

En relación a sus fases metabólicas, las fluoroquinolonas también pueden ser clasificadas de acuerdo a su principal vía de aclaramiento y eliminación [aunque estos mecanismos no son exclusivos, en algunos compuestos una vía de eliminación predomina claramente sobre las otras (DALHOFF, 1998)]:

- Renal: ofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, rufloxacina y clinafloxacina.
- Hepática: difloxacina, pefloxacina y grepafloxacina.
- Renal y hepática: marbofloxacina, norfloxacina, danofloxacina, fleroxacina enoxacina y trovafloxacina.
- Renal, hepática y gastrointestinal: flumequina, ciprofloxacina y esparfloxacina.

Se estima que el ciclo enterohepático de las fluoroquinolonas no es significativo y que las altas concentraciones de fluoroquinolonas encontradas en las heces en varias especies, provienen de su eliminación trans-intestinal.

La **Tabla 9** presenta las fases metabólicas de las quinolonas empleadas en medicina veterinaria (BROWN, 1996).

Los metabolitos oxidados tales como los N-demetil metabolitos, tienen actividad antibacteriana (KÜNG, *et al.*, 1993; PRESCOTT y YIELDING, 1990), mientras que los metabolitos conjugados carecen de esta actividad (NIX y SCHETANG, 1988).

Algunos de los metabolitos de ciertas fluoroquinolonas tienen una muy significativa actividad antimicrobiana, como es el caso de la enrofloxacina y su metabolito ciprofloxacina (ANADÓN *et al.*, 1999, 2000a).

**Tabla 9.** Fases metabólicas de las quinolonas.

<b>Fases metabólicas</b>	<b>Fármaco</b>
<b>Oxidación del anillo piperazínico</b>	Norfloxacin → oxonorfloxacin Ciprofloxacina → oxociprofloxacina
<b>N-dealquilación</b>	Enrofloxacin → ciprofloxacina Danofloxacin → demetil-danofloxacin Marbofloxacina → demetil-marbofloxacina
<b>N-oxidación</b>	Marbofloxacina → N-óxido marbofloxacina Danofloxacin → N-óxido-danofloxacin
<b>Hidroxilación</b>	Ácido nalidíxico → ácido hidroxinalidíxico Flumequina → 7-hidroxi-flumequina
<b>Glucuronidación</b>	Norfloxacin → glucurónido de norfloxacina Difloxacina → glucurónido de difloxacina Sarafloxacina → glucurónido de sarafloxacina Flumequina → glucurónido de flumequina
<b>Sulfoxidación</b>	Ciprofloxacina → sulfociprofloxacina
<b>Formilación</b>	Ciprofloxacina → formilciprofloxacina
<b>Acetilación</b>	Norfloxacin → N-acetilnorfloxacin

Modificado de BROWN, 1996.

Con respecto a la flumequina, se ha descrito que se metaboliza ampliamente a glucurónidos conjugados y en menor proporción en 7-hidroxi-flumequina, en vacas, perros, ratas, y aves, y solo un bajo porcentaje permanece como compuesto inalterado (LEMELAND *et al.*, 1981; DORRESTEIN *et al.*, 1983; HARRISON *et al.*, 1984, 1986; DECOLIN *et al.*, 1987; MEVIOUS *et al.*, 1990a; ANADÓN *et al.*, 2008). Los glucurónidos conjugados se detectan únicamente en orina, mientras que el metabolito 7-hidroxi-flumequina se encuentra en plasma y orina, donde contribuye a la acción bactericida ya que posee actividad antimicrobiana (HARRISON *et al.*, 1984, 1986; SCHUPPAN *et al.*, 1985; DELMAS *et al.*, 1997). En el hombre el principal metabolito es un glucurónido de la flumequina y solo alrededor del 6% se metaboliza en 7 hidroxi-

flumequina (LEMELAND *et al.*, 1981; HARRISON *et al.*, 1984; SCHUPPAN, *et al.*, 1985).

### Excreción

Las quinolonas se eliminan por tres vías, que en orden de importancia son: renal, hepática e intestinal, presentando variaciones farmacocinéticas con respecto a la relativa contribución de los cambios asociados a su eliminación (NEUMAN, 1988; NIX y SCHENTAG, 1988; LODE *et al.*, 1989; NEU, 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989b; VANCUTSEM *et al.*, 1990; DUDLEY, 1991; FITTON, 1992; SÖRGEL y KINZIG, 1993a, b; SHARMA *et al.*, 1994; BROWN, 1996; HOOPER, 1998; BLONDEAU, 1999; WALKER, 2000).

En este sentido, el principal factor que determina dichas diferencias farmacocinéticas entre las quinolonas es el mecanismo de eliminación renal, que puede realizarse por secreción tubular y por filtración. Con excepción del ácido nalidixico, para las fluoroquinolonas el aclaramiento renal glomerular representa el mayor porcentaje en su eliminación (NIX y SCHENTAG, 1988; NEU, 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989b; FILLASTRE *et al.*, 1990; VANCUTSEM *et al.*, 1990; ANADÓN, 1992; FITTON, 1992; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; HOOPER, 1998). Los compuestos no polares, como la difloxacin en realidad son reabsorbidos desde los túbulos renales y presentan valores prolongados de semivida plasmática de eliminación (10h); por el contrario, las fluoroquinolonas más polares, tales como la ciprofloxacina, se caracterizan por un aclaramiento renal elevado, siendo la semivida plasmática de eliminación más corta (3-5 h) (NIX y SCHENTAG, 1988; VANCUTSEM *et al.*, 1990; FITTON, 1992; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; HOOPER, 1998). El aclaramiento renal de las fluoroquinolonas está muy relacionado con el aclaramiento de la creatinina (DUDLEY, 1991).

La flumequina se elimina por vía renal y extrarenal (HARRISON *et al.*, 1986; MEVIUS *et al.*, 1990a; DELMAS *et al.*, 1997). HARRISON *et al.* (1986), encontraron que en la rata, el 60% de la dosis administrada de flumequina se excretaba por vía renal; mientras que en el perro se excretaba en un rango de 40 a 60% del fármaco administrado, dependiendo de la vía de administración. Este hecho parece indicar que la excreción biliar desempeña un papel fundamental en la eliminación de este compuesto en perros. Este mismo hecho fue observado por RUIZ-GARCÍA *et al.* (1999), quienes en su estudio en ratas encontraron que tan solo el 2-3% de la dosis total de flumequina se eliminaba por vía biliar.

La flumequina a lo largo de los años ha sido objeto de múltiples estudios farmacocinéticos entre los que podemos señalar los trabajos realizados en humanos (HARRISON *et al.*, 1984; SCHUPPAN *et al.*, 1985; DECOLIN Y NICOLAS, 1987; ROYER-MORROT *et al.*, 1991; VREE *et al.*, 1992), en animales de experimentación, ratas (HARRISON *et al.*, 1986; RUIZ-GARCÍA *et al.*, 1999) y en perros (HARRISON *et al.*, 1986), en animales domésticos de consumo humano, en cerdos (GUYONET *et al.*, 1996; VILLA *et al.*, 2005), en ganado vacuno (MEVIUS *et al.*, 1990a, b; MEIJER *et al.*, 1994), en ovejas (DELMAS *et al.*, 1997), y en aves (ATEF *et al.* 1987; SAMAHA *et al.* 1991; COCHET *et al.* 1997; GUYONET *et al.* 1997; SANDERS *et al.* 1997; ANADÓN *et al.* 2008) y en distintas especies de peces como la anguila (*Anguilla anguilla*) (BOON *et al.*, 1991; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1994; HANSEN y HOSBERG, 2000a); bacalao (*Gadus morhua*) (HANSEN y HOSBERG, 2000b; VIKMO *et al.*, 2005); carpa común (*Cyprinus carpio*) (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1994), dorada (*Sparus aurata*) (RIGOS *et al.*, 2003); halibut o fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (SAMUELSEN y ERVIK, 1997; HANSEN y HOSBERG, 1999); lubina (*Dicentrarchus labrax*) (RIGOS *et al.*, 2002; TOURAKI *et al.*, 2010); pez gato

americano (*Ictalurus punctatus*) (PLAKAS *et al.*, 2000); pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1994); porredana o perca maculosa (*Symphodus melops*) (SAMUELSEN y ERVIK, 2001); rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (HANSEN y HOSBERG, 1999); salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (O'GRADY *et al.*, 1988; ROGSTAD *et al.*, 1993; ELEMA *et al.*, 1994, 1995; MARTINSEN y HORSBERG, 1995; SOHLBERG *et al.*, 1999, 2002; ELLINGSEN *et al.*, 2002); tabernero (*Ctenolabrus rupestris*) (HANSEN y HOSBERG, 2000b); trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*) (SOHLBERG *et al.*, 1990, 1994) y trucha común (*Salmo trutta*) (O'GRADY *et al.*, 1988).

Las **Tablas 10 y 11** recogen parámetros cinéticos de la flumequina en especies de consumo recogidos de la literatura científica.

**Tabla 10.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina en animales domésticos

productores de alimentos

Especie	Terнера <sup>1</sup>			Oveja <sup>2</sup>		Pollo <sup>3</sup>		Pollo <sup>4</sup>	
	I.V.			I.V.	I.M.	I.V.	Oral	I.V.	Oral
Dosis	10 mg/kg			6 mg/kg		12 mg/kg			
Edad	1 semana	5 semanas	18 semanas	6 – 12 meses		-	-	peso corporal 2 kg	
t <sub>1/2α</sub> (h)	0,850 ±0,637	1,090 ±0,290	0,780 ± 0,298	-	-	-	0,35 ± 0,04	1,12 ±0,11	1,55 ±0,39
t <sub>1/2β</sub> (h)	7,10 ±2,23	6,58 ± 1,68	6,04 ± 2,05	-	-	4,94 ± 0,15	3,83 ± 0,18	6,91 ±1,44	10,05 ±1,12
V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,754 ± 0,157	0,944 ± 0,13	0,956 ± 0,195	0,52 ± 0,24	-	2,63 ± 0,10	-	1,60 ±0,33	-
AUC (mg/L/min)	5709,6 ± 667,2	3021,6 ±306,6	3285,6 ± 523,2	19, 58 ± 2,63	16,47 ± 5,71	31,90 ± 1,15	20,90 ± 1,24	44,67 ±3,34	25,46 ± 2,62
MRT (h)	-	-	-	2,26 ± 1,02	11,62 ± 4,45	-	-	5,90 ± 1,06	9,96 ±0,87
F (%)	-	-	-	-	85,00 ± 0,13	-	67,39 ± 5,14	-	57,00 ±5,88
CL (ml/min/kg)	1,78 ± 0,25	3,23 ± 0,31	3,10 ± 0,44	0,31 ± 0,03	-	6,41 ± 0,19	-	0,27 ±0,02	0,270 ±0,001
K <sub>12</sub> /K <sub>21</sub>	0,90 ± 0,39	1,06 ± 0,23	0,72 ±0,22	-	-	-	-	-	-

(1) MEVIOUS *et al.*, 1990a. (2) DELMAS *et al.*, 1997. (3) ATEF *et al.*, 1987.

(4) ANADON *et al.*, 2008

**Tabla 11.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina en especies acuáticas

Especie	Salmón <sup>1</sup>		Salmon <sup>2</sup>		Salmon <sup>3</sup>	
	I.V. 10°C	Oral (Alimento medicado) 10°C	I.V. 6-8°C	Oral (Alimento medicado) 6-8°C	I.V 5°C.	Oral 5°C
Dosis	25 mg/kg		10 mg/kg	25 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
t <sub>1/2α</sub> (h)	3,1	-	1,34	-	1,3	-
t <sub>1/2β</sub> (h)	22,8	-	39,8	29,9-40,6	23	-
V <sub>ss</sub> (L/kg)	3,5	-	3,76	-	-	-
C <sub>max</sub> (µg/ml)	-	1,42	-	1,71-2,61	-	2,6
T <sub>max</sub> (h)	-	6	-	9,95-27,1	-	12
AUC (µg·L·h)	140,2	62,7	130,5	116,9-149,7	46,5	110
MRT (h)	-	-	51,7	-	-	-
CL (L/h/kg)	0,18	-	1,75	-	-	-
F (%)	-	44,7	-	38,0-41,6	-	46

(1) MARTINSEN Y HORSBERG, 1995. (2) ELEMA *et al.*, 1995.

(3) ROGSTAD *et al.*, 1993

**Continuación. Tabla 11.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina en especies acuáticas.

Especie	Pez Gato <sup>4</sup>		Halibut <sup>5</sup>		Rodaballo <sup>5</sup>		Halibut <sup>6</sup>	Anguila <sup>7</sup>		
	I.V.	Oral	I.V.	Oral	I.V.	Oral	I.V.	I.V.	Oral	Baño (1 h)
Dosis	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg 10°C		10 mg/kg 18°C		12 mg/kg 9°C	10 mg/kg 23°C		10 mg/L 23°C
t <sub>1/2α</sub> (h)	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
t <sub>1/2β</sub> (h)	24,6	21,8	32	43	34	42	43	314	208	126
V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,527	-	2,99	-	3,75	-	2,3	3,4	-	-
C <sub>max</sub> (µg/ml)	-	3,06	-	1,4	-	1,9	-	11,2	9,3	2,1
T <sub>max</sub> (h)	-	13,7	-	7	-	7	-	-	7	-
AUC (µg/ml/h)	67,3	149	83,7	47,5	59,3	5,8	239,5	831	707	165
MRT (h)	35,5	-	25,1	-	22,2	-	44	283	171	181
CL (ml/h/kg)	14,9	-	0,12	-	0,17	-	0,052	0,012	-	-
F (%)	-	44,3	-	56	-	59	-	-	85	19,8

(4) PLAKAS *et al.*, 2000. (5) HANSEN y HORSBERG, 1999.

(6) SAMUELSEN y ERVIK, 1997. (7) HANSEN y HORSBERG, 2000a.

### 1.5. Toxicidad y reacciones adversas

Es importante considerar que con el uso clínico de cualquier fármaco, es posible observar la incidencia de reacciones adversas y efectos secundarios. En el caso de las quinolonas, y concretamente de la flumequina, compuesto objeto de nuestro estudio; es importante conocer estos efectos, así como la depleción de residuos, para evitar posibles riesgos de salud pública.

En general las quinolonas se caracterizan por ser antimicrobianos considerablemente seguros y bien tolerados cuando se emplean a las dosis terapéuticas recomendadas (FITTON, 1992; HOOPER, 1998; BERTINO y FISH, 2000; FISH, 2001; SHAKIBAEI *et al.*, 2001). Sin embargo, la terapia con quinolonas está asociada a varias reacciones adversas y efectos secundarios que se derivan de su potencial tóxico sobre diversos sistemas del organismo (TAKAYAMA *et al.*, 1995; STAHLMANN y

LODE, 1998, 1999; RUBINSTEIN, 2001; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002). A principios del año 1980 y después de conocer los perfiles toxicológicos de las primeras quinolonas, se inició el desarrollo de nuevos compuestos que presentaran un mayor margen de seguridad y tolerancia (NORRBY, 1991). No existen diferencias significantes en cuanto al riesgo de toxicidad que presentan las quinolonas y el de otros antimicrobianos (**Tabla 12**) (WOLFSON y HOOPER, 1991a; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; FISH, 2001). Por otra parte, se debe tener en cuenta que las quinolonas son agentes quelantes y presentan afinidad por cationes divalentes y trivalentes, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Al}^{3+}$  lo cual parece indicar que las variaciones en el equilibrio electrolítico, como sucede por una dieta deficiente en magnesio, puede incrementar el riesgo de toxicidad inducida por quinolonas (RUBINSTEIN, 2001; SHAKIBAEI *et al.*, 2001).

**Tabla 12.** Porcentaje de reacciones adversas asociadas al uso de quinolonas y otros antimicrobianos.

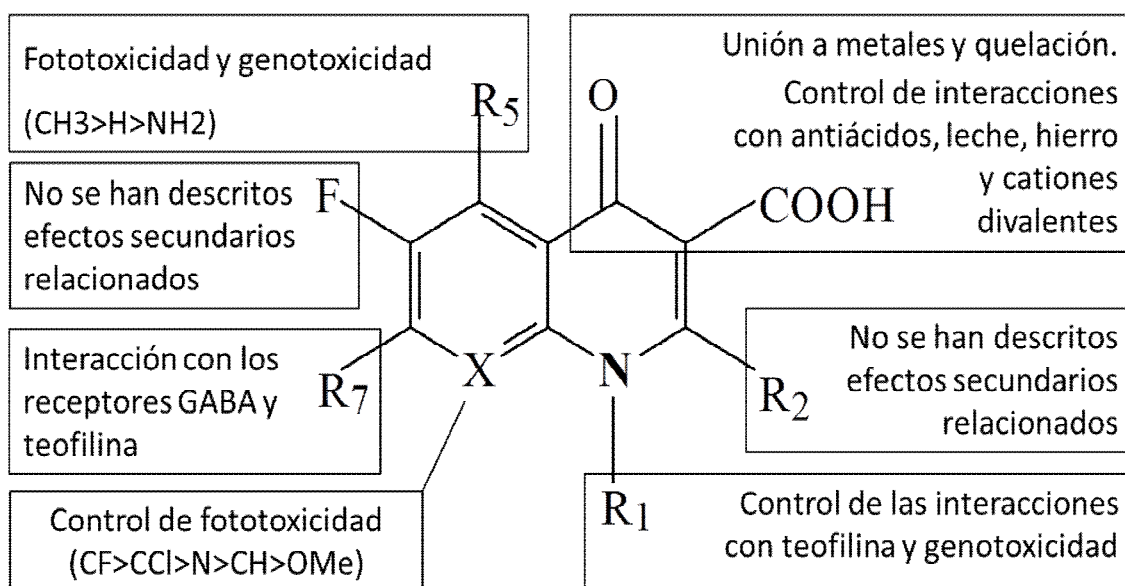
<b>Antimicrobiano</b>	<b>Reacciones adversas (%)</b>
<b>Quinolonas</b>	<b>3-40%</b>
Penicilinas	6-35%
Cefalosporinas	12-39%
Doxiciclina	19-23%
Eritromicina	39%

FISH, 2001

Entre los principales efectos tóxicos asociados a la terapia con quinolonas, se incluyen efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), toxicidad ocular, cardiotoxicidad, efectos sobre el aparato gastrointestinal, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción, efectos en articulaciones, cartílagos, ligamentos y huesos, fotosensibilidad, efectos sobre el sistema inmune, y también se han reportado algunos casos de mutagenicidad (CHRIST *et al.*, 1988; WOLFSON y

HOOPER, 1989a; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; TAKAYAMA *et al.*, 1995; LECOEUR-BITCHATCHI y KOLF-CLAUW, 1999; PAPICH, 1998; BLONDEAU, 1999; BERTINO y FISH, 2000; KIM *et al.*, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002).

En la **Figura 5** se muestran los efectos secundarios asociados con los sustituyentes específicos de la estructura química fundamental de las quinolonas. El sustituyente de la posición 1 se relaciona a la interacción con teofilina y la genotoxicidad. No se conoce ningún efecto secundario asociado al sustituyente de la posición 2. El grupo carboxilo de la posición 3 y el oxígeno de la posición 4 están involucrados con la quelación y la unión a metales, por lo que son los responsables de las interacciones con antiácidos, leche, hierro, y otros cationes divalentes. El sustituyente de la posición 5 está estrechamente ligado a la fototoxicidad y la genotoxicidad. En esta posición un grupo metilo causa más efectos secundarios que un átomo de hidrógeno, mientras que un grupo amino es el menos relacionado con la aparición de reacciones adversas. No se han reportado reacciones adversas relacionadas con el átomo de fluor en la posición 6; mientras que el sustituyente de la posición 7 está relacionado con la actividad de unión de los receptores GABA en el cerebro, por lo cual es responsable de los efectos sobre el SNC, y también se relaciona con la interacción con teofilina. La posición 8 es clave en la relación estructura-efectos secundarios de las quinolonas, y está muy relacionada con la fototoxicidad, y un átomo de fluor en esta posición es potencialmente más fototóxico que un átomo de cloro o de nitrógeno. También las quinolonas dihalogenadas se asocian en mayor grado con la fototoxicidad (BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001). En la **Tabla 13** se presentan las fluoroquinolonas con mayores efectos tóxicos que limitan su uso clínico.



**Figura 5.** Relación estructura-efectos secundarios de las quinolonas.

**Tabla 13.** Fluoroquinolonas con significancia clínica limitada por sus efectos tóxicos específicos. (RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002)

Fluoroquinolona	Toxicidad específica	Año*
Enoxacina	Inhibición del complejo citocromo P450.	1985
Pefloxacina	Tendinopatías, fototoxicidad.	1985
Fleroxacina	Fototoxicidad, efectos sobre el SNC.	1990
Sitafloxacina	Fototoxicidad.	1991
Temafloxacina <sup>+</sup>	Síndrome urémico hemolítico.	1992
Lomefloxacina	Fototoxicidad.	1993
BAYγ3118 <sup>+</sup>	Fototoxicidad.	1993
Esparfloxacina	Fototoxicidad, prolongación del intervalo QT.	1994
Tosufloxacina	Trombocitopenia, nefritis.	1996
Trovafloxacina <sup>+</sup>	Hepatotoxicidad, efectos sobre SNC.	1999
Grepafloxacina <sup>+</sup>	Prolongación del intervalo QT, arritmia, náuseas.	1999
Clinafloxacina <sup>+</sup>	Fototoxicidad, hipoglicemia, inhibición del complejo citocromo P450.	1999

\* Año de introducción a la terapéutica o año en que se detuvo su desarrollo o comercialización; <sup>+</sup> Desarrollo discontinuo o cese de comercialización poco después del inicio de uso en la terapéutica.

Es importante destacar que aun cuando la flumequina es una quinolona que se ha utilizado desde hace varias décadas, existe información limitada sobre sus aspectos toxicológicos, aunque partiendo de la evaluación de la información toxicológica disponible, podemos afirmar que la flumequina es un compuesto razonablemente seguro si se respetan las condiciones de modo de empleo recomendadas, siendo su perfil toxicológico similar al de otras quinolonas de uso en medicina veterinaria. A continuación se describen los efectos más relevantes de la toxicidad de las quinolonas y de la flumequina en particular.

#### Efectos tóxicos sobre el SNC

Los síntomas de toxicidad que se presentan en el SNC asociados al uso de quinolonas, en general, son moderados o inexistentes si estos fármacos se utilizan a las dosis terapéuticas recomendadas. Cuando se presentan, los mas frecuentes son vértigo, dolor de cabeza, insomnio, visión anormal, cansancio y euforia o depresión; y de menor incidencia son los casos en que puede producirse una neurotoxicidad severa, donde se observan reacciones psicóticas, alucinaciones y convulsiones, estos efectos se observan principalmente en pacientes humanos, y se han relacionado con casos de sobredosificación originada por administración concomitante de las quinolonas con teofilina o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (CHRIST *et al.*, 1988; AKAHANE *et al.*, 1989; DAVIES y MAESEN, 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989a, 1991a; CHRIST, 1990; SHAH y MULERT, 1990; NORRBY, 1991; PATON y REEVES, 1991; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; FITTON, 1992; KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU *et al.*, 1995; TAKAYAMA *et al.*, 1995; HOOPER, 1998; STAHLMANN y LODE, 1999; BERTINO y FISH, 2000; COHEN, 2001; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). En humanos se observan estos efectos con una incidencia en un rango de 4,4 al 16,5% (CHRIST, 1990).

Así mismo, se ha reportado neurotoxicidad epileptogénica durante la quimioterapia con quinolonas (OOIE *et al.*, 1997). Algunos estudios han señalado la implicación de las fluoroquinolonas con la aparición de neuropatía periférica (AOUN *et al.*, 1992; HEDENMALM y SPIGSET, 1996; COHEN, 2001).

El uso de quinolonas en animales ha provocado muy pocos efectos secundarios sobre el comportamiento; señalándose en algunas ocasiones, una disminución de la actividad motriz (CHRIST *et al.*, 1988; PATTERSON, 1991). Una particularidad importante del uso de las quinolonas, es que cuando son administradas a dosis muy altas, o por vía intravenosa y de forma rápida, pueden provocar convulsiones; por lo cual, en consideración a este riesgo, se recomienda respetar las dosis terapéuticas, y que la administración de estos fármacos por vía intravenosa, se lleve a cabo de forma lenta y constante (BROWN *et al.*, 1990; VANCUTSEM *et al.*, 1990).

Para realizar una correcta evaluación de los efectos sobre el SNC es importante separar los efectos moderados de los efectos severos que requieren la suspensión del tratamiento. Los efectos moderados, como vértigo, dolor de cabeza, insomnio, visión anormal, cansancio, y euforia o depresión se observan frecuentemente, y los efectos neurotóxicos de mayor importancia, tales como reacciones psicóticas, alucinaciones y convulsiones, que aun siendo poco frecuentes (<0.5%) y principalmente aparecen en personas, están asociados con la terapia de varias quinolonas, deben tenerse en consideración antes de instaurar un tratamiento con estos fármacos (STAHLMANN, 2002).

Existe considerable información sobre los efectos de las quinolonas sobre el SNC a nivel experimental. YAMAMOTO *et al.* (1980) observaron que el ácido pipemídico presentaba pocos efectos sobre los patrones del electroencefalograma (EEG)

en ratas y gatos, mientras que el ácido nalidíxico mostraba efectos excitatorios ligeros en ratas y convulsiones en gatos. También encontraron que la cinoxacina no causaba en ratas efectos sobre el EEG pero en gatos inducía periodos excitatorios prolongados. En estudios similares, MORIKAWA *et al.* (1988a), indicaron que la levofloxacinina presentó en conejos efectos mínimos o nulos sobre el EEG, pero en perros provocaba convulsiones y alteraciones en el EEG. YAMAMOTO *et al.* (1988), confirmaron la aparición de periodos convulsivos en gatos después de la administración de lomefloxacinina y enoxacinina, y periodos excitatorios tras la administración de ofloxacinina. TAKASUNA *et al.* (1992), observaron en gatos que la levofloxacinina, norfloxacinina, enoxacinina y ciprofloxacina por vía intravenosa inducían alteraciones en el EEG y convulsiones generalizadas en el 25, 100, 50 y 100 % de los casos, respectivamente. Los perros y gatos parecen ser las especies animales más susceptibles y en menor grado las ratas y conejos (TAKAYAMA *et al.*, 1995).

El ácido nalidixico (ISOZAKI y MATSUNO, 1971), cinoxacina (YAMAMOTO *et al.*, 1980), enoxacina (MATSUNO *et al.*, 1984), lomefloxacinina (MORIKAWA *et al.*, 1988a), norfloxacinina (OHKUBO *et al.*, 1981), ofloxacinina (KOJIMA *et al.*, 1984), esparfloxacina (DODO *et al.*, 1991), y levofloxacinina (TAKASUNA *et al.*, 1992), provocaban en ratones disminución de la actividad motora. Por el contrario, se observó que el ácido pipemídico (MATSUNO *et al.*, 1975) y tosufloxacinina (HIRAI *et al.*, 1989) no presentaban ningún efecto sobre la actividad motora. La mayoría de las quinolonas a dosis elevadas parecen inhibir de manera espontánea la actividad motora.

El mecanismo de acción por el que las quinolonas actúan sobre el SNC no se conoce con claridad. Se han realizado estudios toxicológicos y bioquímicos con la intención de explicar los efectos sobre el SNC observados en condiciones terapéuticas, sin embargo no se ha determinado con exactitud cuál es la diana molecular de las

quinolonas en el SNC. Se apunta la existencia una posible interacción entre los receptores del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitorio del SNC y las fluoroquinolonas (CHRIST *et al.*, 1988; AKAHANE *et al.*, 1989; JANKNEGT, 1990; CHRIST, 1990; NORRBY, 1991; PATTERSON, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a; ANADÓN, 1992; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; HOOPER, 1998; LECOEUR-BITCHATCHI y KOLF-CLAUW, 1999; STAHLMANN y LODE 1999; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). Se sugiere que las fluoroquinolonas inhiben el receptor GABA. Este efecto antagónico de las quinolonas parece ser dependiente del sustituyente que presentan en la posición 7 del anillo heterocíclico. De esta manera, los derivados en cuya estructura tengan un grupo piperazínico libre en esta posición presentan mayor actividad sobre el SNC que aquéllos con grupos piperazínicos metilados. Sin embargo, los efectos de las quinolonas sobre la unión del GABA y sus receptores son moderados y no se conoce explicación sobre el efecto epileptogénico. Por otra parte, en presencia de fenbufeno se potencia el efecto inhibitorio de las quinolonas sobre el GABA (AKAHANE *et al.*, 1989; BROWN, 1996; BLONDEAU, 1999; STAHLMANN y LODE, 1999; BALL, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002).

En algunos estudios de neurotoxicidad llevados a cabo para la evaluación de varias quinolonas, se ha usado como modelo una porción de hipocampo de rata. La determinación del potencial de acción en la región CA1 del hipocampo de rata permitió evaluar el potencial excitatorio de las quinolonas. La ofloxacina, ciprofloxacina, y moxifloxacina aumentaban la amplitud del potencial de acción de forma moderada y dosis-dependiente; la trovafloxacina y clinafloxacina presentaban un mayor potencial excitatorio (STAHLMANN, 2002).

### Efectos tóxicos sobre el aparato gastrointestinal

Los efectos de las quinolonas sobre el aparato gastrointestinal suelen ser muy frecuentes, pero de poca gravedad; se han descrito náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea, dispepsia, acidez y otros síntomas menos comunes; efectos observados principalmente en humanos (WOLFSON y HOOPER, 1989a; ZINNER, 1989; SHAH y MULERT, 1990; NORRBY, 1991; PATON y REEVES, 1991; FITTON, 1992; TAKAYAMA *et al.*, 1995; HOOPER, 1998; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; STAHLMANN, 2002). Sin embargo, es importante destacar que algunas reacciones gastrointestinales como náuseas y vómitos también pueden ser signos de neurotoxicidad (STAHLMANN, 2002). Se han realizado algunos estudios con quinolonas, administrándolas a dosis muy elevadas (de 15 a 50 veces la dosis terapéutica) observándose en los animales tratados vómitos y anorexia. En dosis más próximas a las utilizadas en la práctica clínica en perros (de 20 a 22 mg/kg) se ha observado vómitos que desaparecieron al reducir la dosis a 16,5 mg/kg (WALKER *et al.*, 1989; BROWN *et al.*, 1990). Así mismo, se debe tener en consideración que existen diferencias con respecto a la frecuencia de estos efectos; tomando como referencia algunos datos disponibles, se conoce que algunas nuevas quinolonas como la grepafloxacina, a dosis elevadas, presenta una mayor incidencia de efectos sobre el tracto gastrointestinal (STAHLMANN y LODE, 1999).

Algunos estudios indican que con el uso de ciprofloxacina, norfloxacina y pefloxacina se presentaban alteraciones sobre la microflora intestinal, alteraciones que, en el caso de ciprofloxacina y norfloxacina, se normalizaban en un periodo de 1-2 semanas tras la suspensión del tratamiento, no ocurriendo lo mismo en aquellos animales tratados con pefloxacina, en los que se prolongó el tiempo necesario para que la flora intestinal retornara a la normalidad (BLONDEAU, 1999).

En un estudio realizado por KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU *et al.* (1995), encontraron que la flumequina, enoxacina y norfloxacin inhibían los efectos contráctiles en el ileon inducidos por la activación de los receptores GABA de forma dosis-dependiente.

Se ha demostrado que el ácido nalidixico produce en conejos disminución de la motilidad gástrica e intestinal (DOTEUCHI *et al.*, 1980). HIRAI *et al.* (1989), encontraron que la tosufloxacin, incrementaba ligeramente la motilidad gástrica e ileal, pero reducía la motilidad del colon. Estudios con ofloxacin (KOJIMA *et al.*, 1984) y lomefloxacin (MORIKAWA *et al.*, 1988b) demuestran en perros cambios débiles en la motilidad gástrica, y disminución de la motilidad intestinal. En el caso de levofloxacin, en perros, se produjo una disminución transitoria de la motilidad gástrica e intestinal, seguida de un ligero incremento (TAKASUNA *et al.*, 1992). Estos hallazgos sugieren que las quinolonas carecen de efecto directo sobre la motilidad del tracto gastrointestinal relacionada con la producción de diarrea. Es muy frecuente encontrar heces blandas o diarrea en animales a los que se les han administrado quinolonas u otros agentes antibacterianos, lo que puede ser consecuencia de la liberación de toxinas por parte de las bacterias patógenas, cuyo incremento anormal en el intestino ocasiona la destrucción de la flora bacteriana normal. No existen datos sobre el daño histopatológico en animales tras una terapia prolongada con quinolonas. El mecanismo por el cual se produce diarrea en el hombre debe ser similar al observado en animales (TAKAYAMA *et al.*, 1995).

#### *Efectos tóxicos sobre el sistema cardiovascular*

Se ha demostrado que las quinolonas presentan efectos cardiotóxicos. En animales, tras la administración intravenosa se observaron efectos tales como hipotensión y taquicardia (CHRIST *et al.*, 1988; TAKAYAMA *et al.*, 1995; HOOPER,

1998; STAHLMANN y LODE, 1999; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; LODE, 2001; RUBINSTEIN, 2001); efecto observado especialmente en perros y gatos (TAKAYAMA *et al.*, 1995). En virtud de que la intensidad y duración de estos efectos es dosis-dependiente, se recomienda que las quinolonas de uso intravenoso preferentemente se administren en forma de infusión (CHRIST *et al.*, 1988; HOOPER, 1998; STAHLMANN y LODE, 1999). También se han observado tras la administración oral de quinolonas hipotensión y taquicardia (CHRIST *et al.*, 1988; STAHLMANN, 2002).

En perros anestesiados a los que se les administró lomefloxacin, se observó una disminución de la resistencia arterial y un incremento en el flujo sanguíneo en la arteria femoral (MORIKAWA *et al.*, 1988a). También, la levofloxacin, en perros anestesiados, disminuyó la resistencia de la arteria femoral y produjo en el flujo sanguíneo variaciones mínimas (TAKASUNA *et al.*, 1992). Estos hechos sugieren que la resistencia arterial de la vasculatura periférica decrece después de la administración intravenosa de quinolonas, y que esta disminución desempeña un importante papel en la hipotensión observada en perros anestesiados.

Durante el tratamiento con cualquier quinolona pueden presentarse alteraciones en el ritmo cardiaco, pero se presenta mayor incidencia con compuestos como grepafloxacin y esparfloxacin (BLONDEAU, 1999; STAHLMANN y LODE, 1999; BERTINO y FISH, 2000; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). Estas dos quinolonas presentan similitudes por el sustituyente de la posición 5 de su estructura molecular: un grupo metilo en la grepafloxacin y un grupo amino en la esparfloxacin; posiblemente esta similitud estructural es la explicación del elevado potencial cardiotoxic que poseen estos dos compuestos (STAHLMANN, 2002). Durante los estudios toxicológicos realizados con grepafloxacin, previos a su comercialización, se

observo un marcado potencial para inducir arritmias cardiacas. Sin embargo, el efecto sobre el intervalo QT en humanos tras la administración oral, resulto ser mínimo y se consideró que no presentaba riesgo para el hombre. Después de algunos años, se han descrito algunos casos de efectos cardiacos severos asociados con el uso de grepafloxacin, y a pesar de ser considerados de incidencia rara, se prohibió la comercialización de este fármaco (BERTINO y FISH, 2000; STAHLMANN, 2002).

Considerando que la presión sanguínea es una función de la potencia cardiaca y la resistencia vascular periférica total, la hipotensión inducida por quinolonas puede ser resultado de una vasodilatación periférica y/o depresión cardiaca. Todas las quinolonas en animales sanos disminuyen la frecuencia cardiaca, aunque algunos de estos compuestos causan efectos mínimos, por lo que se requieren estudios al respecto, (particularmente sobre la potencia cardiaca) siendo necesario investigar el mecanismo por el que se produce la hipotensión que se ha observado (TAKAYAMA *et al.*, 1995).

Existen pocos datos de reacciones adversas sobre el sistema cardiovascular en humanos por el uso clínico de quinolonas (SMYTHE y RYBAK, 1989; ZINNER, 1989; SHAH y MULERT, 1990; NORRBY, 1991; PATON y REEVES, 1991; GEDDES, 1993; BERTINO y FISH, 2000). Se podría sugerir que los efectos hipotensores observados en animales, particularmente en perros y gatos, son selectivos para estas especies.

BEDNARCZYK *et al.* (1991), realizaron un estudio en personas sanas, no fumadores, y observaron que los individuos tratados con ciprofloxacina presentaron un decrecimiento significativo en el flujo sanguíneo cerebral, en comparación con los individuos tratados con temafloxacina o con un placebo.

### Efectos hepatotóxicos

Existen numerosos trabajos que nos indican la existencia de reacciones adversas a nivel hepático, pudiendo concluir que el aumento de las transaminasas hepáticas es la principal causa de hepatotoxicidad por quinolonas (ANADÓN, 1992; HOOPER, 1998; YOSHIDA *et al.*, 1999).

El uso terapéutico de trovafloxacin esta asociado con reacciones las hepáticas impredecibles, las cuales no parecen tener una relación específica su estructura química (BALL, 2000; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; STAHLMANN, 2002). Existen datos de toxicovigilancia obtenidos a partir del uso clínico de esta quinolona que nos indican que en el año 1999 se relacionó con 140 casos aparecidos de hepatotoxicidad (RUBINSTEIN, 2001). El potencial hepatotóxico de esta quinolona se describió primero en perros, donde se observó un aumento de los niveles enzimáticos hepáticos, lo que se relacionaba con una degeneración hepatocelular vacuolar y centrilobulillar, y necrosis; estos efectos fueron reversibles y se observaron cuando se administraba a dosis más altas que las terapéuticas. Los efectos hepatotóxicos a dosis terapéuticas observados en animales no se consideraron relevantes (STAHLMANN, 2002).

Las quinolonas que presentan estructuras químicas de naftiridinas no se han asociado con la aparición de efectos tóxicos hepáticos, estos efectos suelen aparecer en presencia de compuestos con dos o tres nitrógenos en su anillo químico fundamental (RUBINSTEIN, 2001).

Se tiene evidencia del desarrollo de tumores hepáticos en ratones a los que se les administró flumequina durante 18 meses, efecto que no fue observado en ratas que se sometieron a tratamiento con esta quinolona durante dos años. Se sugiere que los

efectos hepatocarcinógenos de la flumequina observados en ratones son dependientes del daño hepático y de la consiguiente proliferación celular (YOSHIDA *et al.*, 1999).

### Efectos tóxicos renales

Los efectos tóxicos renales provocados por el uso de quinolonas son de especial relevancia, en virtud de que estos fármacos presentan una alta capacidad de acumulación en los riñones y en otros tejidos del tracto genitourinario, debido a que esta es su principal vía de excreción. Los principales efectos renales observados incluyen nefritis intersticial, hematuria y cristaluria, así como también una disminución de la función renal y un incremento en el peso de los riñones (CORRADO *et al.*, 1987; SCHLUTER, 1987; CHRIST *et al.*, 1988; WOLFSON y HOOPER, 1989a; VANCUTSEM *et al.*, 1990; PATTERSON, 1991; ANADÓN, 1992; FITTON, 1992; BERTINO y FISH, 2000; FANOS y CUZZOLIN, 2000; RUBINSTEIN, 2001). También se ha observado que el uso crónico de algunas fluoroquinolonas como ofloxacina, enoxacina y pefloxacina, a altas dosis (>100 mg/kg/día) puede originar daños a nivel de los túbulos renales (MAYER, 1987).

El uso de temafloxacina en terapéutica humana se asoció con el síndrome hemolítico, el fallo renal y la trombocitopenia (BALL, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). La incidencia de este proceso tóxico fue de 1 en un total de 5000 prescripciones, lo que representa un porcentaje de incidencia muy bajo, pudiendo ser esto la causa de que no fuera detectado durante los estudios clínicos previos a su comercialización. A raíz de este incidente, se procedió a retirar el uso terapéutico de la temafloxacina. El mecanismo por el cuál se produce este efecto secundario es desconocido, y no ha sido observado por el uso de otras quinolonas (STAHLMANN, 2002).

Los efectos renales de las quinolonas no se consideran como efectos tóxicos directos ya que su aparición esta condicionada a la precipitación de material extraño, principalmente cristales en el riñón (CHRIST *et al.*, 1988). El pH alcalino de la orina, observada en algunas especies de animales como ratas y monos, bajo condiciones normales, puede favorecer la precipitación de cristales ya que la cristaluria es un efecto pH-dependiente. Este efecto es muy raro en el hombre por la acidez de su orina, lo que propicia una buena eliminación de las quinolonas que en general son insolubles en pH neutro o alcalino. La dosis necesaria para producir cristaluria varía dependiendo del fármaco utilizado y la especie animal (CHRIST *et al.*, 1988; NORRBY, 1991; PATTERSON, 1991).

#### *Efectos tóxicos sobre la función reproductora*

Se ha descrito que diversas quinolonas producen efectos tóxicos en hembras reproductoras, en consideración de lo cual se han realizado diferentes estudios para conocer el potencial tóxico de estos compuestos sobre la reproducción, especialmente durante el desarrollo (FITTON, 1992; TAKAYAMA *et al.*, 1995; STAHLMANN y LODE, 1999). En estos experimentos realizados en ratas, principalmente se ha descrito toxicidad maternal, caracterizada por pérdida de peso y disminución en la ingesta de alimento. Dentro de los efectos embriotóxicos se ha descrito que los fetos muestran decrecimiento del peso, osificación retardada, y un marcado incremento de malformaciones músculo-esqueléticas (WOLFSON y HOOPER, 1989a; FITTON, 1992; STAHLMANN y LODE, 1999). En otro estudio en ratas, realizado por KIM *et al.* (2000) para investigar el potencial teratógeno de la quinolona DW-116 encontraron que al ser administrado durante la organogénesis a dosis de 500 mg/kg se presentaba una moderada incidencia de toxicidad maternal, pero una significativa toxicidad durante el desarrollo embrionario, y a dosis de 125 mg/kg la embriotoxicidad fue mínima. Los

efectos tóxicos durante la gestación se caracterizaron por un aumento de la reabsorción embrionaria y muerte fetal, decrecimiento de tamaño y peso del feto, decrecimiento del peso de la placenta, alta incidencia de malformaciones músculo-esqueléticas y reducida osificación esquelética. Las principales malformaciones fetales se detectaron en cabeza, pulmón, corazón, vértebras y esternón; así mismo se observó retardo en la osificación del esternón, metacarpos, metatarsos y vértebras sacrocaudales, lo que se relacionó con la reducción del peso fetal. También la ofloxacina se ha asociado en el ratón con anomalías congénitas (HOOPER, 1998).

Estudios de toxicidad sobre la reproducción en perros y ratas de las quinolonas (ácido pipemídico, norfloxacin y pefloxacin) demostraron que estos compuestos provocan alteraciones en la espermatogénesis, así como daños testiculares, como la atrofia (CHRIST *et al.*, 1988; TAKAYAMA *et al.*, 1995; ADEL *et al.*, 2000). ADEL *et al.* (2000), evaluaron en ratas los efectos de la ofloxacin, ciprofloxacina y pefloxacin sobre la estructura y fisiología testicular, encontrando que la actividad testicular disminuía el 39,8%, 62,7% y 60,7% respectivamente; de igual manera la cantidad, motilidad y producción de espermatozoides se redujeron considerablemente. En el caso de ofloxacin, la disminución de la actividad testicular fue dosis-dependiente y produjo cambios histopatológicos marcados, resultados que indicaban la evidente implicación de estos compuestos sobre las funciones reproductoras del macho.

Los mecanismos neuroendocrinos podrían estar involucrados en estos efectos (CHRIST *et al.*, 1988). Existe una variabilidad en la susceptibilidad acorde a cada especie animal y se considera que los parámetros farmacocinéticos de las quinolonas también están implicados en estas variaciones (TAKAYAMA *et al.*, 1995).

No se dispone en el hombre de información sobre la aparición de reacciones adversas sobre la fertilidad (TAKAYAMA *et al.*, 1995). Actualmente tampoco existen

datos respecto a la aparición de efectos teratógenos en recién nacidos de madres a las que se les administraron quinolonas durante la gestación. Sin embargo por falta de datos, estos fármacos no se consideran seguros durante el periodo reproductivo, por lo que su uso se ha restringido en mujeres gestantes y en lactancia y solo se utilizan en casos especiales y bajo estricta vigilancia, a expensas del riesgo potencial que pueden conllevar (TAKAYAMA *et al.*, 1995; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001).

#### *Efectos tóxicos sobre cartílagos, tendones, articulaciones y huesos*

Todas las quinolonas poseen, en mayor o menor grado, potencial para inducir efectos sobre tejidos estructurales corporales, afectando con mayor severidad los cartílagos (CHRIST *et al.*, 1988; WOLFSON y HOOPER, 1989a, 1991a; NORRBY, 1991; PATTERSON, 1991; GOOTZ y MCGUIRK, 1994; TAKAYAMA *et al.*, 1995; FÖRSTER *et al.*, 1996, 1998; HOOPER, 1998; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; BERTINO y FISH, 2000; EGERBACHER *et al.*, 2000, 2001; STAHLMANN *et al.*, 2000a, b; DAVENPORT *et al.*, 2001; DE SARRO y DE SARRO, 2001; LODE, 2001; RUBINSTEIN, 2001; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; THIEL *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002). La artropatía en animales jóvenes es la forma más común de toxicidad de todas las quinolonas estudiadas hasta el momento (ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992; TAKAYAMA *et al.*, 1995; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; BERTINO y FISH, 2000; STAHLMANN *et al.*, 2000a; DE SARRO y DE SARRO, 2001), siendo aparentemente los perros mas sensibles que las ratas y conejos (CHRIST *et al.* 1988; PATTERSON, 1991; HILDEBRAND *et al.*, 1993; TAKAYAMA *et al.*, 1995); también se ha descrito en marmotas, y hasta el momento parece que este efecto no se observa en monos (WOLFSON y HOOPER, 1991a). En ratas el ácido nalidíxico, norfloxacin, ofloxacin y ciprofloxacina administrados por vía oral en dosis diarias de 100 a 500

mg/kg p.c., durante cuatro semanas, producen lesiones articulares similares. Las lesiones en los cartílagos articulares inducidas por quinolonas en animales en crecimiento son de rápida aparición y de carácter irreversible; en los animales adultos no ocurre una reacción tan evidente, aunque existen datos de artropatías en perros adultos posteriores a un tratamiento oral con pefloxacina (140 mg/kg/día) durante 12 meses. El mecanismo a nivel molecular por el que se desarrolla este efecto es desconocido, pero se observa erosión del cartílago articular acompañada de efusión, no inflamatoria libre de células, en la cavidad articular. El cartílago afectado no tiene capacidad de regeneración, por lo tanto estas lesiones son el punto de inicio de una artropatía deformante. En las partes del cartílago donde el daño es mas severo puede producirse una erosión; al igual que los productos de descomposición soluble del cartílago provocan una reacción irritante de la sinovia en forma de derrame (CHRIST *et al.*, 1988; NORRBY, 1991; PATTERSON, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a; HOOPER, 1998; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; BERTINO y FISH, 2000; STAHLMANN, 2002).

INGHAM *et al.* (1977), estudiando el ácido pipemidico en perros jóvenes fueron los primeros en describir la aparición de efectos condrotóxicos relacionados con el uso de quinolonas. HILDEBRAND *et al.* (1993) realizaron en perros de raza Beagle un estudio para evaluar el potencial condrotóxico de algunas quinolonas y encontraron que en los animales tratados con ácido nalidixico, los signos clínicos, hallazgos macroscópicos y microscópicos se observaban a dosis de 200 mg/kg y en el caso de animales tratados con ciprofloxacina los signos clínicos, hallazgos macroscópicos y microscópicos se observaban a dosis de 100, 70 y 30 mg/kg p.v. respectivamente. Estos resultados se compararon con los obtenidos en un estudio *in vitro* con condrocitos de cartílago articular de perros, que se aislaron e incubaron con las mismas quinolonas; concluyéndose que la inhibición de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y la

síntesis de proteoglicano son la principal causa del daño en estos tejidos. En una investigación en la que se evaluaron en roedores los efectos de la pefloxacina sobre el proteoglicano y colágeno en el tendón de aquiles, se demostró que el estrés oxidativo inducido por quinolonas alteraba el anabolismo del proteoglicano y el colágeno oxidado. Este efecto se observó, después de la administración única de pefloxacina, existiendo cambios bifásicos en la síntesis de proteoglicano; el tratamiento durante varios días indujo daño oxidativo del colágeno Tipo 1 (STAHLMANN, 2002).

Como posible explicación de la patogénesis de los efectos condrotóxicos de las quinolonas, son las propiedades quelantes de estos fármacos que ocasionan la formación de radicales y finalmente la lesión del cartílago. En el año de 1950 diversos estudios realizados mostraron que en perros jóvenes que presentaban deficiencias de magnesio se observaron alteraciones muy parecidas a aquellas descritas tras el tratamiento con quinolonas. El nexo que existe entre la actividad quelante de las quinolonas y los efectos condrotóxicos es sustentado por el hecho de que las lesiones articulares asociadas al tratamiento con quinolonas pueden disminuir con la administración de magnesio o tocoferol (FÖRSTER *et al.*, 1998; STAHLMANN y LODE, 1999; DAVENPORT *et al.*, 2001; STAHLMANN *et al.*, 2000a; DE SARRO y DE SARRO, 2001; STAHLMANN, 2002).

Las quinolonas también inducen reacciones adversas en los tendones, principalmente tendinitis y ruptura (CHRIST *et al.*, 1988; PATTERSON, 1991; FITTON, 1992; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; BERTINO y FISH, 2000; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002). Estudios recientes han mostrado alteraciones ultraestructurales en los tendones de ratas jóvenes y adultas de aparición posterior al tratamiento con quinolonas; en uno de estos estudios, en el que los animales se trataron con ofloxacina, se encontraron cambios ultraestructurales en los tendocitos,

principalmente dilatación de las organelas, y presencia de vacuolas en el citoplasma, efectos que se incrementaban en ratas que recibían una dieta deficiente en magnesio. Se considera que las fluoroquinolonas y una deficiencia de magnesio producen patrones muy similares de alteraciones bioquímicas en los tendones (SHAKIBAEI *et al.*, 2001). En todos los casos de alteraciones en los tendones se distinguen diversas fases tal como el edema inflamatorio y/o congestivo, que puede confundirse con una trombosis. Se presenta dolor e inflamación y, en el 50% de los casos es bilateral. Si no se toma una decisión terapéutica adecuada puede aparecer la ruptura del tendón. Las manifestaciones persisten durante semanas o meses y ocasionan una merma significativa del funcionamiento del tendón (CHRIST *et al.*, 1988; PATTERSON, 1991; FITTON, 1992; STAHLMANN y LODE, 1998, 1999; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002). El mecanismo por el cual se desarrollan estas alteraciones no se ha esclarecido, pero se considera que la fisiopatología de la tendinopatía es similar a la de la artropatía (SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002).

En humanos, la experiencia clínica indica que el riesgo de reacciones adversas ocasionadas por las quinolonas en los tejidos estructurales del organismo es superior que el de otros antimicrobianos (BERTINO y FISH, 2000; SHAKIBAEI *et al.*, 2001; STAHLMANN, 2002), viéndose incrementado en pacientes con desórdenes renales, particularmente en aquellos que se sometieron a un trasplante renal (SHAKIBAEI *et al.*, 2001). En el año 1991 se observaron los primeros casos de ruptura de tendones en humanos asociados con el uso de quinolonas. Se realizaron estudios comparativos con las fluoroquinolonas ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina y pefloxacina, en los que esta última quinolona demostró tener un mayor potencial para producir tendinitis y ruptura de los tendones, efectos que pueden presentarse incluso hasta 120 días después de concluir el tratamiento (STAHLMANN, 2002).

En el hombre, las quinolonas se usan frecuentemente en pediatría, particularmente en casos de fibrosis cística y en infecciones del tracto genitourinario considerándose en general fármacos potencialmente seguros, destacando el uso de ciprofloxacina (STAHLMANN, 2002).

### Hipersensibilidad y fototoxicidad

Es bien conocido que las quinolonas pueden causar reacciones de hipersensibilidad cutánea, entre las que podemos citar el eritema, el prurito y la urticaria. Igualmente se ha observado fototoxicidad con todas las quinolonas; de los primeros compuestos sintetizados destaca el ácido nalidixico con una relativamente alta incidencia de este efecto secundario. Así mismo, algunos de estos fármacos antimicrobianos han demostrado que poseen un potencial fotomutagénico y fotocarcinogénico que parece incrementarse con la disminución de su fotoestabilidad (BRAUNER, 1975; BARAN y BRUN, 1986; PETRI y TRONNIER, 1986; CHRIST *et al.*, 1988; WOLFSON y HOOPER, 1989a, 1991a; NORRBY, 1991; FITTON, 1992; FERGUSON, 1995; TAKAYAMA *et al.*, 1995; HOOPER, 1998; SHIMODA y KATO, 1998; STAHLMANN y LODE 1998, 1999; BLONDEAU, 1999; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; LODE, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). Estos efectos se observan principalmente en humanos; la fototoxicidad es el efecto que mas se asocia con el uso de esparfloxacina (BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001). En personas, el ácido nalidixico se asocia con una foto-reacción, en particular en mujeres. Esta aparente selectividad puede deberse al mayor uso de este fármaco por mujeres, ya que existe una mayor prevalencia de enfermedades en el tracto urinario en comparación con el hombre (BRAUNER, 1975). Así mismo, debe destacarse que algunos investigadores consideran que los

pacientes con fibrosis cística tienen mayor predisposición a la fototoxicidad asociada al uso de quinolonas (DE SARRO y DE SARRO, 2001).

La fototoxicidad parece ser inducida principalmente por el sustituyente en posición 8; así quinolonas sustituidas con un átomo de fluor en esta posición, tales como lomefloxacin o fleroxacin, o las que tienen un átomo de cloro, como la sitafloxacin y la clinafloxacin, generalmente muestran un alto potencial fototóxico, mientras que las que tienen el grupo metoxi en esta posición como la moxifloxacin presentan fotoestabilidad (TAKAYAMA *et al.*, 1995; HOOPER, 1998; BLONDEAU, 1999; STAHLMANN y LODE, 1999; BALL, 2000; LODE, 2001; RUBINSTEIN, 2001; STAHLMANN, 2002). También se ha señalado que las quinolonas dihalogenadas se relacionan en mayor grado con los efectos fototóxicos (RUBINSTEIN, 2001).

En estas reacciones, la absorción por la piel de la radiación ultravioleta causa liberación de calor, peróxidos y radicales libres, conduciendo a daño tisular. Por lo tanto es un hecho que pacientes tratados con quinolonas y expuestos a la luz solar tienen altas probabilidades de presentar tales reacciones; aunque debido al amplio uso en terapia clínica de estos fármacos hay poca evidencia de que estos efectos adversos ocurran (LEBEL *et al.*, 1986; ARCIERI *et al.*, 1987; TAKAYAMA *et al.*, 1995; BLONDEAU, 1999), por lo que se considera que estas reacciones son fotoalérgicas y no fototóxicas (BRAUNER, 1975). Es también de importancia en la incidencia de estas reacciones adversas, la susceptibilidad individual de los pacientes; es decir, pacientes con pigmentación cutánea baja son más susceptibles, sin embargo esta información no indica que las fluoroquinolonas sigan un mismo patrón. Así, posteriormente a la administración de fluoroquinolonas durante un corto periodo de tiempo, puede necesitarse un consumo prolongado de estos fármacos a dosis diarias superiores a las dosis terapéuticas para que se produzcan estos efectos adversos (FERGUSON, 1995).

Un estudio realizado en ratones a los que se les administro lomefloxacin, fleroxacin, ciprofloxacina, ofloxacina o ácido nalidixico, manteniendo las mismas concentraciones plasmáticas, fueron comparados con un grupo control al que se le administró 8-metoxisoraleno. La fototoxicidad ante la irradiación ultravioleta ocasionó tumores con todos los fármacos. Mientras que en la mayoría de los animales tratados, los tumores fueron papilomas benignos, en los ratones tratados con lomefloxacin se desarrollaron carcinomas en las células escamosas con una media del periodo de latencia para la mitad de los animales que desarrollaron tumores de forma similar a lo observado en los animales al que se le administro 8-metoxisoraleno (FERGUSON, 1995). En consideración al potencial de riesgo humano asociado al uso de fluoroquinolonas; se recomienda reducir la exposición a los rayos solares y ultravioleta durante el periodo de tratamiento (STAHLMANN, 2002).

#### Efectos tóxicos oculares

Entre los efectos tóxicos oculares que se han observado por el uso de las quinolonas se pueden citar la opacidad lenticular en perros y ratas, los cambios eléctricos e histopatológicos en gatos; y los cambios eléctricos en perros.

La flumequina se ha utilizado mucho tanto en medicina humana como veterinaria, y ha sido asociada con algunos casos de toxicidad ocular (BALL, 2000). Pero no es el único compuesto de este grupo que provoca efectos nocivos oculares, por lo que se consideró importante investigar qué compuestos quinolonas están asociados con una mayor incidencia de problemas oculares. Se han realizado estudios en monos a los que se les ha tratado con ciprofloxacina, evaluando sus niveles y no se ha encontrado que se produzca acumulación a largo plazo, por lo que se considera a la ciprofloxacina como una de las quinolonas que provocan menos efectos tóxicos oculares. Por otra parte, el ácido nalidixico parece ser mas toxico a nivel ocular que otras quinolonas

como ciprofloxacina o norfloxacina (CHRIST *et al.*, 1988; PATTERSON, 1991). En otros estudios, se ha reportado en ratas opacidad del cristalino tras el uso de dosis elevadas de rosoxacina (NORRBY, 1991; TAKAYAMA *et al.*, 1995), y en perros y gatos tras el uso de pefloxacina (NORRBY, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a). También se ha descrito la aparición de retinopatías, especialmente en el gato, tras el uso de quinolonas, particularmente la enrofloxacina (TAKAYAMA *et al.*, 1995; GELATT *et al.*, 2001).

### Efectos tóxicos sobre el sistema inmunológico

Al igual que muchos compuestos antibacterianos, las quinolonas además de sus propiedades antibacterianas son capaces de modular la respuesta inmune. Estos compuestos tienen numerosos efectos sobre el sistema inmune, en particular sobre la respuesta proliferativa de las células mononucleares, actuando sobre la secreción de la interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF) así como en la actividad fagocitaria y bactericida de estas células (ROCHE *et al.*, 1987; BAILLY *et al.*, 1990). Por otra parte, debido a su gran capacidad de penetración tisular, las quinolonas pueden penetrar en el tejido óseo y a partir de aquí llegar a las células fagocitarias medulares (ROCHE *et al.*, 1987).

BAILLY *et al.* (1990) sugieren que las quinolonas tienen particular tendencia a acumularse en los tejidos inflamados, pudiendo ser estos compuestos reguladores de la respuesta inflamatoria, propiedad que es conocida para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y la interleucina 1 (IL-1).

Se conoce que la ciprofloxacina, pefloxacina y ofloxacina a concentraciones mayores o iguales a 50 µg/ml son capaces de inhibir la producción de IL-1 por estimulación de los lipopolisacáridos en monocitos humanos, actuando de manera

similar en la producción extracelular del TNF, siendo ambos efectos dosis-dependientes. Pero estas no son las únicas quinolonas que interfieren en el sistema inmunológico (ROCHE *et al.*, 1987; BAILLY *et al.*, 1990).

Con la finalidad de explicar las bajas concentraciones de IL-1 y TNF inducidas por quinolonas, se ha investigado la posible participación del AMPc, sobre el cual las quinolonas aumentan sus concentraciones en los monocitos con la consiguiente disminución de IL-1 y TNF, interviniendo fagocitos mononucleares a través de diferentes mecanismos de acción (BAILLY *et al.*, 1990). Por otra parte; en animales, la IL-2 produce efectos secundarios parecidos a los que se observan cuando se administran altas dosis de fluoroquinolonas. Además, la producción de IL-2 se incrementa en linfocitos expuestos a fluoroquinolonas (NORRBY, 1991).

Diversos estudios señalan la interferencia que presenta la flumequina en el sistema inmune de los peces (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1995a, b, 1996), observándose sobre procesos inmunológicos como proliferación linfocítica y producción de anticuerpos.

### Mutagenicidad

Las quinolonas han dado resultados positivos en algunos ensayos de mutagenicidad *in vitro* (SCHLUTER, 1987). Este efecto ha sido demostrado con todas las quinolonas disponibles, desde el ácido nalidíxico hasta la ciprofloxacina y marbofloxacina, aunque no necesariamente en los mismos sistemas de ensayo *in vitro*. La cuestión surge de la interpretación de los datos basados en ensayos microbiológicos, tales como el test de Ames, ya que estos fármacos son tan efectivos frente al organismo de ensayo, *Salmonella typhimurium*, que su actividad bactericida domina cualquier evidencia de mutagenicidad.

A pesar de que el metabolismo del ADN bacteriano es la principal diana de acción, el potencial mutagénico de estos fármacos en hepatocitos de ratones, en general, parece ser bajo (WOLFSON y HOOPER, 1989a; FERGUSON, 1995).

Recientemente varias quinolonas, incluyendo el ácido nalidixico, ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina, y ofloxacina, han mostrado tendencia a presentar errores en el sistema SOS en la bacteria (HOWARD *et al.*, 1993; POWER y PHILLIPS, 1993). Mediante el test de Ames se observó reversión dosis-dependiente de *his<sup>-</sup>* a *his<sup>+</sup>* con cepas *S. typhimurium* TA102 (*uvr<sup>+</sup>*) pero no con *S. typhimurium* (*uvr<sup>-</sup>*), lo que sugiere que una escisión funcional y la reparación del sistema SOS fue esencial para la mutagénesis bacteriana inducida por quinolonas (POWER y PHILLIPS, 1993).

La detección de las interacciones entre las quinolonas y el genoma es muy importante, especialmente para el desarrollo de nuevas quinolonas con características químicas que no presenten riesgos mutagénicos (CHRIST *et al.*, 1988).

#### Interacciones farmacológicas

En la práctica clínica puede ser necesaria la combinación de quinolonas con otros fármacos, incluso con otros agentes antimicrobianos. Sin embargo, es importante conocer las reacciones que pueden presentarse como consecuencia de estas asociaciones. Se han descrito diversos tipos de interacciones medicamentosas entre las quinolonas y otros fármacos o xenobióticos, interacciones que son abordadas desde diferentes puntos de vista microbiológico y farmacológico (**Tabla 14**) (VERGIN y METZ, 1991). Estas posibles interacciones medicamentosas se pueden producir con antiácidos, sucralfato, hierro, cimetidina, teofilina, cafeína, antipirina, antiinflamatorios no esteroideos como fenbufeno, warfarina y ciclosporina (DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; PRINCE *et al.*, 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989a; ANADÓN, *et al.*,

1990; FLOR *et al.*, 1990; JANKNEGT, 1990; STEIN, 1991; VERGIN y METZ, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1989a; 1991a; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; LACARELLE *et al.*, 1994; MIZUKI *et al.*, 1996; STAHLMANN y LODE, 1998; BERTINO y FISH, 2000; LODE, 2001; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001). Las interacciones farmacológicas de las quinolonas son de considerable importancia clínica si se producen alteraciones en sus propiedades farmacocinéticas que pueden dar como resultado un aumento de sus efectos tóxicos (STEIN, 1991).

**Tabla 14.** Posibles interacciones de las quinolonas

Efecto		Provocado por interacción con
Reducción de la actividad antimicrobiana		Bajo pH Altas concentraciones de Mg <sup>2+</sup> (complejos quelantes)
Metabolismo hepático		Teofilina Cafeína Agonistas-H <sub>2</sub> AINE (Fenbufeno)
Disminución de la absorción intestinal		Alimentos Antiácidos
Quinolona	Fármaco con el que interactúa	Interacción
Enoxacina	Teofilina y cafeína	Descenso significativo del aclaramiento plasmático de la teofilina y la cafeína
Pefloxacina Ciprofloxacina	Teofilina y cafeína	Descenso significativo del aclaramiento plasmático de la teofilina y la cafeína
Lomefloxacina Norfloxacina Ofloxacina	Teofilina y cafeína	Menor o no detectable descenso del aclaramiento de la teofilina y la cafeína
Enoxacina	Antipirina	Descenso del aclaramiento de la antipirina
Pefloxacina	Cimetidina	Descenso del aclaramiento no renal de la cimetidina
Enoxacina	Warfarina	Descenso del aclaramiento de la R-warfarina

NORRBY, 1991.

Los antiácidos minerales del tipo hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio cuando interactúan con fluoroquinolonas inhiben de forma dosis-dependiente la absorción y reducen significativamente la biodisponibilidad de estos compuestos, como ocurre en el caso de la ciprofloxacina y ofloxacina (HÖFFKEN *et al.*, 1985; RUBINSTEIN y SEGEV, 1987; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989a; 1991a; FLOR *et al.*, 1990; JANKNEGT, 1990; STAHLMANN y LODE, 1998; MIZUKI *et al.*, 1996; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001; LODE, 2001). El mecanismo por el cuál se desarrolla esta interacción es posiblemente por un proceso de quelación entre los iones del metal y el grupo 4-ceto, 3-carboxilo del anillo de las fluoroquinolonas (STEIN, 1991; MIZUKI *et al.*, 1996; LODE, 2001). Pero es posible evitar que esto ocurra si se administran los antiácidos y fármacos afines 4 horas después de la administración de las quinolonas (BERTINO y FISH, 2000; LODE, 2001). De la misma manera se sugiere que preparados multivitamínicos que contienen iones metálicos como zinc o hierro disminuyen la biodisponibilidad de la ciprofloxacina (POLK 1989). En pacientes que requieren una terapia clínica para el control de la acidez gástrica, se recomienda el uso de ranitidina en combinación con ciprofloxacina, ofloxacina o fleroxacina, ya que se ha comprobado que tiene poca importancia clínica la interacción entre estos fármacos (WOLFSON y HOOPER, 1991a). Existe evidencia de que la cimetidina disminuye el aclaramiento renal de las fluoroquinolonas de un 15 a 20% e incrementa la semivida de eliminación en un 20% aproximadamente (STEIN, 1991). También se ha demostrado que el bismuto y el carbón activo interfieren en la absorción de las fluoroquinolonas (JANKNEGT, 1990). Estas interacciones se presentan con mayor incidencia en compuestos como ciprofloxacina y aparecen menos con las demás fluoroquinolonas (LODE, 2001).

Otra importante interacción medicamentosa de las quinolonas se produce con el metabolismo de otros agentes químicos originando reacciones adversas ocasionales. Es de particular importancia clínica la interacción con compuestos del grupo metilxantinas como teofilina, cafeína y paraxantina (MAESEN *et al.*, 1984; NIKI *et al.*, 1987; BEM y MANN, 1988; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; PRINCE *et al.*, 1989; FÜHR *et al.*, 1990; WOLFSON y HOOPER, 1989a; 1991a; CHRIST, 1990; JANKNEGT, 1990; UPTON, 1991; VERGIN y METZ, 1991; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; LODE, 2001). De este grupo de metilxantinas, es la teofilina el compuesto que posee mayor grado de interacción con las quinolonas. Se ha descrito en la literatura científica, que algunas quinolonas provocan una semivida de eliminación de la teofilina más larga, debido a una disminución de la velocidad de su metabolismo regulado por isoenzimas P450, produciendo una acumulación de este compuesto que puede alcanzar concentraciones plasmáticas que sean tóxicas (MAESEN *et al.*, 1984; NIKI *et al.*, 1987; BEM y MANN, 1988; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; PRINCE *et al.*, 1989; CHRIST, 1990; JANKNEGT, 1990; UPTON, 1991; VERGIN y METZ, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; BROWN, 1996; MIZUKI *et al.*, 1996; BLONDEAU, 1999; RUBINSTEIN, 2001). Este efecto se ha observado tanto *in vivo* (EDWARDS *et al.*, 1988), como *in vitro* (FUHR *et al.*, 1990; SARKAR *et al.*, 1990). Este tipo de interacción fue descrita por primera vez con la enoxacina (WIJNANDS, *et al.*, 1985; ROGGE *et al.*, 1988), donde aparecía una tendencia a incrementar las reacciones adversas de la teofilina; posteriormente se observó que el potencial de interacción que se presentaba con la teofilina no variaba dependiendo de la quinolona utilizada (SÖRGEL y KINZIG, 1993b). Contrastando esto, en otros estudios se observó este mismo tipo de interacción, pero de menor intensidad con ciprofloxacina (RAOOF *et al.*, 1987; SCHWARTZ *et al.*, 1988) y pefloxacina (NIKI *et al.*, 1987), y presentando la ofloxacina (FOURTILLAN *et al.*, 1986), la

norfloxacin (BOWLES *et al.*, 1988) y la lomefloxacin efectos mínimos (STAIB *et al.*, 1989). Sin embargo, BERTINO y FISH (2000) señalan que la coadministración de ciprofloxacina y teofilina requiere una monitorización de las concentraciones plasmáticas de ambos fármacos y el disminuir la dosis de teofilina. Se ha descrito que la ciprofloxacina altera el metabolismo oxidativo de la antipirina catalizado por isoenzimas P450 (DAVIES y MAESEN, 1989; ANADÓN, *et al.*, 1990) en animales de experimentación y de manera similar en el hombre (LUDWIG, *et al.*, 1975, 1988; TOON, *et al.*, 1987). Este mismo efecto se ha observado con enoxacina (S RGEL y KINZIG, 1993b).

Datos adicionales indican además que la combinación de ciprofloxacina y teofilina posee propiedades aditivas disminuyendo la cantidad de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), hecho que puede explicar que algunos pacientes experimenten efectos tóxicos a nivel del SNC, sin presentar elevados niveles de teofilina (AKAHANE *et al.*, 1989; STEIN, 1991).

LACARELLE, *et al.*, (1994) realizaron un estudio con individuos sanos para evaluar los posibles efectos sobre los parámetros farmacocinéticos de la teofilina al coadministrarse con flumequina, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, WIJNANDS *et al.*, (1986), señalan como posible responsable del efecto de las quinolonas sobre el aclaramiento de la teofilina al grupo 4-oxo del anillo quinolenico. De acuerdo a esto, es posible explicar en el caso de ciprofloxacina, pefloxacina o enoxacina, quinolonas que en su metabolismo excretan 4-oxo metabolitos en orina, la correlación que existe entre la excreción urinaria de estos metabolitos (expresada como un porcentaje de la dosis ingerida) y el incremento en los valores del AUC de la teofilina. La flumequina se metaboliza en derivados hidroxilo y derivados glucoronidos con un grupo oxo en la posición 1 (SCHUPPAN *et al.*, 1985), lo

que puede explicar la ausencia de interacciones farmacocinéticas con la teofilina (LACARELLE *et al.*, 1994).

La cafeína, otro compuesto del grupo de las metilxantinas, se ha demostrado que interactúa con las quinolonas de manera similar a la teofilina (DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; WOLFSON y HOOPER, 1989a, 1991a; CHRIST, 1990; JANKNEGT, 1990; STEIN, 1991; VERGIN y METZ, 1991; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; BROWN, 1996; MIZUKI *et al.*, 1996; BLONDEAU, 1999; BERTINO y FISH, 2000; LODE, 2001). Las probabilidades de que se produzca esta interacción varía según la fluoroquinolona, siendo el orden de interacción de mayor a menor el siguiente: enoxacina > ciprofloxacina = norfloxacina > ofloxacina > lomefloxacina (FÜHR *et al.*, 1992). En un estudio *in vitro* realizado por FÜHR *et al.* (1990) en microsomas hepáticos humanos, demostraron que las quinolonas inhibían la 3-demetilación de la cafeína, reacción también observada en adultos. Esta interacción se debe a una inhibición de tipo competitivo ya que las quinolonas actúan en el mismo centro activo que las metilxantinas, como la cafeína de cuyo metabolismo es responsable el complejo enzimático P450 (BUTLER *et al.*, 1989; BERTINO y FISH, 2000). Esta inhibición del metabolismo de la cafeína puede producirse también por otros fármacos que en su metabolismo intervenga la isoenzima P450 responsable de la N-3-demetilación de la cafeína (FÜHR *et al.*, 1990).

Es un hecho conocido que las quinolonas presentan interacciones sobre el metabolismo hepático, actuando en el complejo enzimático citocromo P450 (FUHR *et al.*, 1990; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; RUBINSTEIN, 2001). En investigaciones con microsomas hepáticos humanos se ha observado el efecto inhibitorio de la ofloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y ácido pipemídico sobre la isoenzima P4501A2 (FUHR *et al.*, 1990). Debido al interés que

representa el estudio de las nuevas fluoroquinolonas y que proceso causa su interacción con otros compuestos a nivel del metabolismo, se ha estudiado el efecto de diversas fluoroquinolonas, incluyendo nuevas fluoroquinolonas incluyendo a las que son utilizadas en medicina veterinaria, sobre las isoenzimas P4501A1, P4501A2, P4502B1, P4503A1-2 Y P4502C11 en microsomas hepáticos aislados de ratas tratadas con dosis múltiples de estos compuestos (MARTÍNEZ-LARRAÑAGA *et al.*, 1998, 1999; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; ANADÓN *et al.*, 2000a, b). Estos resultados demuestran que las subfamilias del citocromo, P4501A, P4502B, P4503A y P4502C, pueden estar implicadas en las interacciones farmacológicas de importancia clínica y toxicológica. El conocimiento de estos efectos de las fluoroquinolonas sobre la actividad de las isoenzimas pertenecientes a estas familias del citocromo P450 es de considerable interés a la hora de evitar las posibles reacciones adversas que pueden originarse cuando las fluoroquinolonas son administradas conjuntamente con otros fármacos en tratamientos prolongados, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

Estudios en animales indican que las quinolonas a altas dosis interaccionan con agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tal como el fenbufeno, interfiriendo en la unión del GABA, pudiéndose producir efectos negativos sobre el SNC, tales como convulsiones y síntomas neurotóxicos (AKAHANE *et al.*, 1989; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; CHRIST, 1990; STEIN, 1991; VERGIN y METZ, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a; KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU *et al.*, 1995; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001; LODE, 2001). Las quinolonas actúan produciendo una inhibición competitiva en la unión del GABA a los receptores postsinápticos (TSUJI *et al.*, 1988; POLK, 1989), disminuyendo la liberación del GABA desde las terminaciones nerviosas. Las quinolonas menos liposolubles poseen una considerable afinidad de unión a los receptores GABA, aunque

generalmente con una baja penetración en el SNC. Se ha demostrado que ciertos AINE y sus metabolitos pueden inhibir la unión de receptores GABA a las fluoroquinolonas (AKAHANE *et al.*, 1989; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; CHRIST, 1990; HALLIWELL *et al.*, 1991; DE SARRO y DE SARRO, 2001). El mecanismo de esta interacción es complejo y probablemente involucra otros neurotransmisores (AKAHANE *et al.*, 1989; CHRIST *et al.*, 1989; TAKAYAMA *et al.*, 1995; DE SARRO y DE SARRO, 2001). Con excepción del fenbufeno, las interacciones de las fluoroquinolonas con AINE son de poca importancia clínica (STEIN, 1991; BERTINO y FISH, 2000; DE SARRO y DE SARRO, 2001). DODO *et al.* (1991) encontraron que a excepción de la esparfloxacina, las quinolonas al ser coadministradas con fenbufeno provocaban convulsiones en ratones, en un rango de incidencia de acuerdo al compuesto, en el orden siguiente: enoxacina > norfloxacina > ciprofloxacina > ofloxacina. MURAYAMA *et al.* (1992) también describen la aparición de convulsiones y muerte en ratones después de la administración de quinolonas en combinación con fenbufeno en el siguiente orden: enoxacina > lomefloxacina > norfloxacina. FURUHAMA *et al.* (1992), en un estudio similar, describen la aparición de convulsiones en el siguiente orden: enoxacina > norfloxacina > ciprofloxacina > ofloxacina = levafloxacina. También se ha observado la aparición de convulsiones en la administración concomitante de quinolonas con el ácido 4-bifenilacético, metabolito activo del fenbufeno (AKAHANE *et al.*, 1989; NOZAKI *et al.*, 1991; DE SARRO y DE SARRO, 2001), siendo la incidencia de aparición de convulsiones: enoxacina > norfloxacina > levofloxacina > ciprofloxacina > ofloxacina > esparfloxacina (NOZAKI *et al.*, 1991). MURAYAMA *et al.* (1992) demostraron que otros AINE al ser combinados con enoxacina también producían convulsiones, y que el rango de potencia fue: fenbufeno > flurbiprofeno > ketoprofeno = paranofteno. También señalan que no se

presentaban convulsiones al combinar enoxacina con ibuprofeno, indometacina, ácido mefenámico o aspirina.

Algunos estudios farmacocinéticos revelaron que los niveles de ciprofloxacina en cerebro y líquido cerebroespinal aumentaban tras la coadministración con fenbufeno; estos resultados indicaron que la coadministración con fenbufeno puede facilitar la entrada de ciprofloxacina al interior del SNC, por aumento de los niveles séricos de ciprofloxacina y por incremento en la permeabilidad, favoreciendo la penetración de ciprofloxacina a través de las barreras de sangre-cerebro o sangre-líquido cefalorraquídeo (NAORA *et al.*, 1991).

El proceso de eliminación renal de las quinolonas se ve alterado por interacción con el probenecid (DAVIES y MAESEN, 1989; STEIN, 1991; VERGIN y METZ, 1991). La magnitud de este efecto varía de acuerdo al porcentaje de aclaramiento renal dependiente de la secreción tubular y la existencia de otras vías alternativas para la eliminación. En el caso de la ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina el aclaramiento renal es de un 50% (STEIN, 1991; VERGIN y METZ, 1991). Sin embargo, generalmente no se observan cambios significativos en la aclaramiento renal total de estos fármacos, y esto parece ser un hecho dependiente de la eliminación extra-renal (DAVIES y MAESEN, 1989).

Se han reportado diversos casos de interacción de las fluoroquinolonas con anticoagulantes orales como la warfarina, por competición en la unión a proteínas plasmáticas; el principal efecto observado consecuencia de esta interacción es la prolongación del tiempo de protrombina en sangre (TOON *et al.*, 1987; DAVIES y MAESEN, 1989; POLK 1989; JOLSON *et al.*, 1991; STEIN, 1991; WOLFSON y HOOPER, 1991a; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; DE SARRO y DE SARRO, 2001). A

excepción del ácido nalidixico o compuestos de cuarta generación (por ejemplo grepafloxacina), como ya se ha mencionado las quinolonas no presentan alta unión a proteínas, por lo que no se espera que la warfarina se desplace de sus lugares de unión a la albúmina plasmática (GERDING y HITT, 1989; JOLSON *et al.*, 1991; STEIN, 1991). Otro efecto sería que las quinolonas pueden alterar la producción de los factores de coagulación, como consecuencia de la alteración en la producción de vitamina K por la flora intestinal, sin embargo, no existe evidencia de que las fluoroquinolonas potencien los efectos anticoagulantes de la warfarina. El incremento en la respuesta hipo-protrombinémica a la warfarina se ha observado en fluoroquinolonas que presentan un efecto significativo sobre el metabolismo del fármaco, como es el caso de la ciprofloxacina; y en aquellos agentes que presentan efectos mínimos sobre el aclaramiento hepático intrínseco (JOLSON *et al.*, 1991; LINVILLE *et al.*, 1991; STEIN, 1991). Algunos estudios sugieren que quinolonas como norfloxacina y enoxacina pueden causar efectos considerables sobre el metabolismo de la warfarina (SÖRGEL y KINZIG, 1993b; DE SARRO y DE SARRO, 2001). Sin embargo la interacción entre estos compuestos y la warfarina solo ocurre con la administración de quinolonas en dosis elevadas (DE SARRO y DE SARRO, 2001).

Se han descrito algunos casos donde se presentan interacciones de importancia clínica de las fluoroquinolonas con ciclosporina, incluso se ha considerado la teoría de que al administrar conjuntamente estos fármacos se produce nefropatía (ELSTON y TAYLOR, 1988; AVENT *et al.*, 1988; POLK 1989; STEIN, 1991; THOMSON *et al.*, 1989; WOLFSON y HOOPER, 1991a; SÖRGEL y KINZIG, 1993b; BERTINO y FISH, 2000). Sin embargo, otros estudios no demuestran que se produzcan este tipo de interacciones (JADOUL *et al.*, 1989; KRUGER *et al.*, 1990; ROBINSÓN *et al.*, 1990).

### Toxicidad en organismos acuáticos

Debido a que se han detectado fluoroquinolonas en medios acuáticos, se han realizado estudios de toxicidad de estos fármacos en diferentes organismos no-diana que incluyen *Pseudokirchneriella subcapitata* (formalmente *Selenastrum capricornutum*) *Microcystis aeruginosa* y especies de algas de las divisiones *Chlorophyceae* y *Cyanophyceae* como son *Lemna minor*, *Daphnia magna* y *Pimephales promelas* a efectos de evaluación de la peligrosidad en el medio ambiente. La **Tabla 15** recoge estos ensayos y sus resultados descritos por ROBINSON *et al.* (2005).

**Tabla 15.** Toxicidad, parámetros estadísticos y datos analíticos para *Microcystis aeruginosa*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Lemna minor*. Las concentraciones eficaces medias (CE<sub>50</sub>) se expresan en µg/ml con un intervalo de confianza (IC) expresado entre paréntesis.

<b>Antibiótico</b>	<b>Especie</b>	<b>CE<sub>50</sub> (95% IC)</b>
Levofloxacina	<i>M. aeruginosa</i>	7,9 (6,4-9.4)
Ciprofloxacina	<i>M. aeruginosa</i>	17 (14-20)
Ofloxacina	<i>M. aeruginosa</i>	21 (18-24)
Enrofloxacin	<i>M. aeruginosa</i>	49 (41-56)
Levofloxacina	<i>L. minor</i>	51 (8.6-94)
Clinafloxacina	<i>L. minor</i>	62 (21-103)
Clinafloxacina	<i>M. aeruginosa</i>	103 (86-120)
Lomefloxacina	<i>L. minor</i>	106 (45-167)
Enrofloxacin	<i>L. minor</i>	114 (84-143)
Ofloxacina	<i>L. minor</i>	126 (52-201)
Lomefloxacina	<i>M. aeruginosa</i>	186 (172-200)
Ciprofloxacina	<i>L. minor</i>	203 (41-364)
Clinafloxacina	<i>P. subcapitata</i>	1100 (930-1300)
Flumequina	<i>M. aeruginosa</i>	1960 (1760-2160)
Flumequina	<i>L. minor</i>	2470 (1650-3300)
Enrofloxacin	<i>P. subcapitata</i>	3100 (2600-3600)
Flumequina	<i>P. subcapitata</i>	5000 (4800-5200)
Levofloxacina	<i>P. subcapitata</i>	7400 (6400-8400)
Ofloxacina	<i>P. subcapitata</i>	12100 (10400-13700)
Ciprofloxacina	<i>P. subcapitata</i>	18700 (16200-21200)
Lomefloxacina	<i>P. subcapitata</i>	22700 (19900-25500)

ROBINSON *et al.*, 2005

## **1.6. Residuos de flumequina en productos alimenticios de origen animal**

El uso de medicamentos veterinarios en animales destinados a consumo humano puede ser origen de residuos en los productos alimenticios obtenidos de estos animales tratados. Los medicamentos veterinarios y los compuestos usados como aditivos en la alimentación animal, aunque poseen ventajas evidentes para la sanidad y producción animal, no deben utilizarse sin tener conocimiento de que los productos alimenticios derivados del animal tratado deben responder a las características de calidad y seguridad para el consumidor, que marca la normativa en vigor.

Los residuos de estas sustancias pueden afectar la calidad higiénica (tóxicos bióticos y abióticos) y nutritiva (prótidos, lípidos, glúcidos) de los alimentos, así como su aptitud para las transformaciones tecnológicas y las características organolépticas (olor, aroma, color, textura y terniza). Hoy en día, las técnicas analíticas disponibles son capaces de detectar y determinar cuantitativamente concentraciones cada vez más bajas de residuos de compuestos químicos en los alimentos. Como medida de protección para la Salud Pública y en función de los datos toxicológicos, farmacológicos o microbiológicos se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMR) para los fármacos autorizados en animales productores de alimentos (ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999; ANADÓN *et al.*, 2012).

El Reglamento (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo y modifica la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Además de las definiciones que

figuran en el Artículo 1 de la Directiva 2001/82/CE, en el Artículo 2 del Reglamento (CE) nº 882/2004 y en los Artículos 2 y 3 del Reglamento (CE) nº 178/2002, las siguientes definiciones serán aplicables a efectos de este Reglamento:

a) Residuos de sustancias farmacológicamente activas: todas las sustancias farmacológicamente activas, expresadas en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso del producto alimenticio en fresco, ya sean sustancias o principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los alimentos obtenidos a partir de animales.

b) Animales productores de alimentos: animales criados, mantenidos, sacrificados o recogidos con el fin de producir alimentos.

En el Capítulo II de este nuevo Reglamento se establece una clasificación que incluye una lista de las sustancias farmacológicamente activas y las categorías terapéuticas a las cuales pertenecen. La clasificación determinará también, para cada una de estas sustancias y, si procede, para alimentos o especies concretos, uno de los siguientes elementos:

- c) un límite máximo de residuos;
- d) un límite máximo de residuos provisional;
- e) la ausencia de necesidad de establecer un límite máximo de residuos;
- f) una prohibición de administración de una sustancia.

La Unión Europea establece los límites máximos de residuos (LMR) de un elevado número de principios activos que incluyen todos aquellos autorizados para su uso en animales destinados a consumo humano; algunos LMR de ciertos fármacos son la suma del compuesto inalterado y sus metabolitos activos. Por metabolito se entiende todo producto de biotransformación del principio activo inicial, o compuesto padre,

administrado al animal. Los LMR se fijan basándose en la naturaleza y cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico, farmacológico o microbiológico para la salud humana tal como expresa la ingesta diaria admisible (IDA). Se entiende como IDA la cantidad de una sustancia que puede ser ingerida cada día, durante toda la vida, sin riesgo apreciable para el consumidor.

Los LMR fijados vienen publicados en Reglamentos de la Comisión Europea haciendo constar:

- sustancia farmacológicamente activa;
- residuo marcador (compuesto inicial inalterado, o sus metabolitos, o una combinación de ambos);
- especie animal;
- LMR ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );
- tejido diana (tejido comestible seleccionado para controlar el total de residuos por presentar la menor velocidad de depleción de residuos);
- clasificación terapéutica

El nuevo Reglamento (CE) nº 470/2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, señala en su Artículo 5 que con el fin de garantizar la disponibilidad de medicamentos veterinarios autorizados para enfermedades que afectan a animales productores de alimentos y a la vez que se garantiza un nivel elevado de protección de la salud humana, cuando la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) realice evaluaciones científicas de los riesgos y formulen recomendaciones para la gestión de los riesgos, deberá considerar la posibilidad de utilizar los LMR establecidos para una sustancia farmacológicamente

activa en un producto alimenticio particular, en otro producto alimenticio derivado de la misma especie, o los LMR establecidos para una sustancia farmacológicamente activa en una o más especies para otras especies.

La evaluación científica de los riesgos tendrá en cuenta el metabolismo y la eliminación de las sustancias farmacológicamente activas en las especies animales pertinentes, el tipo de residuos y la cantidad correspondiente que puede ser ingerida por las personas durante toda la vida sin riesgo aparente para la salud, expresada en términos de ingesta diaria admisible (IDA).

Cuando es relevante el LMR, se establece el tiempo de espera o de retirada del fármaco para todo medicamento veterinario en cada una de las especies animales productoras de alimentos como factor de seguridad que permita cumplir el LMR en el momento de consumo. Para el establecimiento del tiempo de espera o de retirada es imprescindible conocer la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción) del medicamento en la especie animal de destino, así como la depleción de sus residuos. Deben recogerse datos de depleción (concentración-tiempo y parámetros farmacocinéticos) de todos los residuos, es decir, residuo total y/o residuo marcador en todos los tejidos comestibles que permitan establecer un valor de LMR que sea compatible con la IDA (ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999). Todo trabajo que implique el estudio de la depleción de residuos para poder establecer el tiempo de espera o de retirada debe realizarse aplicando técnicas analíticas que cumplan con todos los criterios de validación definidos en la Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002. La Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de Marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/82/CEE, define "tiempo de espera" como el periodo de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo y según lo dispuesto en la presente

Directiva, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, a fin de proteger la salud pública, garantizando que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos de residuos de sustancias activas fijados de conformidad con el Reglamento (CE) n° 470/2009.

El Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) de la EMA ha evaluado el nivel máximo de residuos de flumequina aceptable en un alimento de origen animal. Para ello, se ha partido de la IDA, estableciendo el valor de la ingesta diaria aceptable, con un factor de seguridad de 10, en 8,25 µg/kg p.c./día. Por lo tanto, para una persona de 60 kg de peso corporal, esta IDA implicaría una ingesta de 495µg/día (EMEA, 1999). De acuerdo con esta IDA y con la distribución de flumequina en los tejidos, se han establecido para esta molécula los LMR en las distintas especies y tejidos destinados al consumo alimenticio (**Tabla 16**).

A partir de los LMR para cada fármaco o sustancia activa se procede a fijar el tiempo de espera para cada medicamento veterinario, que es el período necesario que transcurre entre la última administración de medicamento a un animal, en las condiciones normales de empleo, y el sacrificio de éste, para que los tejidos destinados al consumo humano no presenten ningún riesgo para la salud del consumidor, es decir, que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los valores de LMR fijados por las autoridades sanitarias.

**Tabla 16.** LMR fijados en el Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 para la flumequina.

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana
<b>Flumequina</b>	<b>Flumequina</b>	Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos	200 µg/kg 300 µg/kg 500 µg/kg 1500 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos y caprinos	50 µg/kg	Leche
		Aves de corral	400 µg/kg 250 µg/kg 800 µg/kg 1000 µg/kg	Músculo Piel y Grasa Hígado Riñón
		<b>Peces</b>	<b>600 µg/kg</b>	<b>Músculo + Piel en proporciones normales</b>
		Todas las demás especies destinadas a la producción de alimentos	200 µg/kg 250 µg/kg 500 µg/kg 1000 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón

El Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, basándose en el ya derogado Reglamento (CEE) nº 2377/90, en su Anexo I describe las sustancias farmacológicamente activas para las que se ha fijado un límite máximo de residuos, clasificando dichas sustancias en dos secciones, la primera sección enumera sustancias autorizadas, y la segunda enumera sustancias prohibidas. La primera sección de sustancias autorizadas incluye: (1) aquellas sustancias autorizadas farmacológicamente activas para las que se ha establecido un límite máximo de residuos, entre las que se encuentra la flumequina, objeto de estudio de la presente

memoria; (2) sustancias no sujetas a un límite máximo de residuos utilizadas en medicina veterinaria y que no suponen un riesgo para la salud del consumidor y (3) sustancias farmacológicamente activas utilizadas en medicina veterinaria y para las que se ha establecido un LMR provisional.

Han sido fijados los valores de LMR de un gran número de principios activos; algunos LMR de ciertos fármacos son la suma del producto inalterado y sus metabolitos o productos de degradación. El Reglamento (UE) nº 37/2010 recoge los valores de LMR actualmente fijados y vigentes para la flumequina, fármaco objeto de estudio de la presente memoria (**Tabla 16**).

La técnica analítica óptima para determinar residuos de flumequina y su metabolito 7-hidroxi-flumequina (residuo marcador) en doradas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método debe cumplir con todos los criterios de validación (EMEA, 1998).

Una vez que alcanza sus concentraciones eficaces tisulares y ejerce su acción farmacológica, la flumequina debe ser excretada por el organismo. En los animales de consumo productores de alimentos es importante evaluar los estudios de depleción tisular, con el fin de poder establecer y recomendar los tiempos de espera tras la medicación y antes del sacrificio del animal que asegure el LMR fijado (parámetro de seguridad alimentaria) como medida de salud pública. Para establecer el periodo de retirada se tienen en cuenta varios factores como el LMR, la forma farmacéutica, la especie animal, la vía de administración, la dosis y la duración del tratamiento.

Para el cálculo del tiempo de retirada en peces teniendo en cuenta el LMR de la flumequina de 600 µg/kg en peces para músculo+piel en proporciones naturales, el tiempo de retirada se calcula utilizando las curvas concentración-tiempo con diversas

aproximaciones estadísticas. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) recomienda para la armonización del cálculo del tiempo de retirada, el uso de un programa específico de regresión lineal como método de elección (EMEA, 2002).

En este área existen escasos estudios de residuos llevados a cabo con la flumequina, fármaco objeto de la presente memoria en especies de peces del área mediterránea, y en concreto con la especie elegida en la presente memoria doradas (*Sparus aurata*) (MALVISI *et al.*, 1997; TYPERNOU *et al.*, 2003) y solamente el trabajo de TYPERNOU *et al.* (2003) calcula el tiempo de retirada según EMEA (2002).

### **1.7. Justificación del trabajo y objetivos**

La acuicultura es una industria que se está expansionando cada vez más, con una producción en el año 2008 de 50 millones de toneladas (FAO, 2010). Las piscifactorías contribuyen aproximadamente con el 50% de la producción mundial de pescado. La producción de alimentos en el medio acuático es alta en Asia (sobre un 90% de la producción mundial) principalmente en China y Japón y alcanza valores de un 57% en medio marino y un 43% en agua dulce, y en términos de tipos de productos alcanza valores de un 60% de peces seguida de un 25% de moluscos y un 10% de crustáceos. Cuando se consideran especies predomina la carpa y las ostras. Las temperaturas del agua en las piscifactorías pueden variar en un rango de 5 °C hasta 25 °C y la salinidad de 0 a 40 g/l.

El uso de fármacos antimicrobianos en acuicultura es un hecho probado en cuanto a la necesidad de tratamiento de ciertas enfermedades, pero para la mayoría de las especies de peces existe una falta de conocimiento de la farmacocinética de estos fármacos lo que conlleva, en la mayoría de las ocasiones, que los regímenes de dosificación utilizados vienen siendo extrapolados de otras especies animales con el consiguiente riesgo toxicológico. En la mayoría de las ocasiones, un agente terapéutico es elegido por el propio

director técnico de la piscifactoría sin datos experimentales de integración farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) (PK-PD).

En nuestro conocimiento, la **Tabla 17** recoge los agentes antimicrobianos de mayor uso en acuicultura (GUICHARD y LICEK, 2006); en dicha tabla no se incluyen datos farmacocinéticos o recomendaciones de regímenes de dosificación, por la falta de estos datos en la literatura científica. Realmente, la elección del agente antimicrobiano en acuicultura es complicada por la ausencia de datos farmacocinéticos experimentales y de datos de campo sobre eficacia clínica de agentes terapéuticos. Son de destacar los trabajos de REIMSCHUESSEL *et al.* (2005) y SAMUELSEN (2006), donde han recopilado algunos datos farmacocinéticos en diferentes especies de peces pero, desafortunadamente, los datos presentan una gran variabilidad; factores tales como la temperatura del agua (BJÖRKLUND y BYLUND, 1990; KLEINOW *et al.*, 1994; SOHLBERG *et al.*, 1994; SAMUELSEN, 2006) y la salinidad (SOHLBERG *et al.*, 2002) pueden ser su causa, así como también ciertas condiciones fisiológicas del pez sano y/o infectado como la inapetencia que dificulta en la administración oral la ingesta completa de la dosis.

**Tabla 17.** Agentes antimicrobianos y sus aplicaciones terapéuticas en acuicultura

ANTIMICROBIANO		INDICACIÓN		USO AUTORIZADO EN ESPECIES ACUÁTICAS
Familia	Fármaco	Especies	Enfermedad	País
<b>β-lactamasas</b>	Amoxicilina	Salmónidos, doradas, lubinas, bagres, anguilas, tilapias	Furunculosis, infecciones bacterianas en branquias, pasteurelisis, edwardsielosis, estreptococosis	Gran Bretaña, Rumanía, Italia, Grecia
<b>Tetraciclinas</b>	Oxitetraciclina y clortetraciclina	Salmónidos, bagres, carpas, especies marinas, peces ornamentales	Vibriosis, pasteurelisis, flexibacteriosis, infecciones por bacterias filamentosas segmentadas, columnaris, yersiniosis, furunculosis, vibriosis de agua fría, botulismo, infección por <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , flavobacteriosis y estreptococosis	UE, ciertos países de Asia, EE.UU., Canadá, Japón
<b>Quinolonas y fluoroquinolonas</b>	Ácido nalidíxico	Salmónidos, anguilas, carpas, peces ornamentales	Furunculosis, vibriosis e infecciones por <i>Pseudomonas</i>	Japón
	Ácido oxálico	Anguilas, carpas, pez dorado, salmónidos, turbot	Infecciones por <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , edwardsielosis, vibriosis, vibriosis de agua fría y furunculosis	Dinamarca, Grecia, Francia, Noruega, Islandia, Bulgaria
	Flumequina	Salmónidos, especies marinas, peces ornamentales	Pasteurelisis, vibriosis, flexibacteriosis, furunculosis, yersiniosis	Croacia, Rep. Checa, Francia, Hungría, Italia, Letonia, eslovaquia

Continuación Tabla 17. Agentes antimicrobianos y sus aplicaciones terapéuticas en acuicultura

ANTIMICROBIANO		INDICACIÓN		USO AUTORIZADO EN ESPECIES ACUÁTICAS
Familia	Fármaco	Especies	Enfermedad	País
Quinolonas y fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Salmónidos, Peces ornamentales	Enfermedad bacteriana del riñón, vibriosis, furunculosis y estreptococosis	
	Sarafloxacina	Salmónidos, bagres	Furunculosis, yersiniosis, edwarseliosis	
Macrólidos	Eritromicina	Limandas, salmónidos	Estreptococosis, lactococosis, enfermedad bacteriana del riñón , piscirickettsiosis e infecciones por <i>Chlamydia</i>	
	Espiramicina, josamicina	Limandas	Estreptococosis	Japón
Anfenicoles	Florfenicol	Salmónidos, especies marinas, anguilas, peces ornamentales	Infecciones por <i>Flavobacterium psychrophilum</i> , furunculosis, vibriosis, flexibacteriosis, pasteurelosis, edwarsieliosis	Gran Bretaña, Irlanda, Letonia, Eslovenia, Noruega, Bulgaria, Lituania, Dinamarca
Sulfamidas	Sulfameracina	Salmónidos de agua dulce	Furunculosis	EE.UU.
	Sulfadimetoxina	Trucha, bagres		
	Sulfadimidina	Salmónidos de agua dulce, carpas		

Continuación Tabla 17. Agentes antimicrobianos y sus aplicaciones terapéuticas en acuicultura

ANTIMICROBIANO		INDICACIÓN		USO AUTORIZADO EN ESPECIES ACUÁTICAS
Familia	Fármaco	Especies	Enfermedad	País
Potenciadores de sulfamidas	Trimetoprim + sulfadiazina o sulfametoxazol	Salmónidos, peces ornamentales, bagres, especies marinas	Infecciones por Aeromonas, yersiniosis, edwardsielosis, vibriosis, pasteurelisis	EE.UU., Canadá, Gran Bretaña, Dinamarca, Croacia, Noruega, Francia, Eslovenia, Italia, Grecia, Alemania
	Ormetoprim + sulfadimetoxina	Salmónidos, bagres	Furunculosis, edwardsielosis	EE.UU.

GUICHARD y LICEK, 2006

El uso no racional de antimicrobianos en acuicultura también puede proporcionar condiciones para la emergencia de bacterias resistentes a antimicrobianos. Las bacterias resistentes son propiamente aquellas que están asociadas a enfermedades en los peces (SMITH *et al.*, 1994). Esta potencial aparición de resistencias hace que el uso excesivo o no-racional de antimicrobianos en acuicultura proporcione un impacto directo sobre el futuro de cualquier agente terapéutico. Lo que es evidente es el número extremadamente limitado de agentes antimicrobianos autorizados para su uso en peces.

Por otra parte, también existe la posibilidad de que el uso no racional de antimicrobianos en acuicultura provoque un impacto sobre la salud pública en términos de resistencias en terapéutica humana. Existen datos de que los genes que codifican resistencias en patógenos humanos y en bacterias asociadas con acuicultura están altamente relacionados (SØRUM, 2006), indicando que estos genes son capaces de transferirse entre los grupos de bacterias. De hecho, el grupo de expertos WHO/FAO/OIE (2007) identifica que los mayores riesgos para la salud pública asociados con el uso antimicrobiano en acuicultura son la emergencia de resistencias transferibles en las bacterias asociadas con la enfermedad de los peces y en aquellas otras bacterias presentes en el medio acuático. También, no debemos olvidar las consideraciones de los residuos de antimicrobianos no solamente desde el punto de vista de seguridad para el consumidor sino también como una consecuencia negativa a la hora de la exportación de pescado a otros países.

Datos de farmacocinética de flumequina en la especie dorada (*Spaurus aurata*) son muy limitados e incompletos (RIGOS *et al.*, 2003) y en la actualidad es del todo importante dado el amplio uso de este fármaco en acuicultura y específicamente en doradas (especie común en el área mediterránea) establecer un régimen de dosificación

racional, es decir eficaz y que evite la aparición de resistencias; por ello investigaciones en este campo son del todo prioritarias.

El objetivo del presente trabajo es doble:

(1) Estudiar bajo condiciones de producción en piscifactoria (agua de mar a 18°C) la farmacocinética de la flumequina en doradas (*Sparus aurata*) a dosis oral única y múltiple de 12 mg/kg p.v. al objeto de predecir una dosis clínicamente eficaz y que minimice la aparición de resistencias y

(2) Determinar la depleción tisular de flumequina (en músculo + piel en condiciones naturales) tras la administración en pienso medicado a una dosificación de 12 mg/kg p.v., dosis seleccionada a partir de los datos farmacocinéticos obtenidos previamente, con el fin de establecer el tiempo de retirada como medida de seguridad alimentaria.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 249 doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) divididas en 3 grupos. Grupo 1 (180 doradas) utilizadas para investigar la cinética plasmática de flumequina tras la administración única y múltiple oral a dosis de 12 mg/kg p.v.; Grupo 2 (49 doradas) utilizadas para el estudio de distribución y depleción tisular de residuos de flumequina después de una dosis múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días; Grupo 3 (20 doradas) no recibieron tratamiento y se emplearon para recoger plasma y muestras tisulares (piel + músculo en proporciones naturales) blanco para determinar la validación del método analítico elegido.

La fase experimental del presente estudio se llevó a cabo en el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Centro El Toruño, Puerto de Santa María (Cádiz).

### 2.1. Protocolo y diseño experimental

#### 2.1.1. Estudio farmacocinético de flumequina en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)

Se seleccionaron 180 doradas sanas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) y en buen estado nutricional de peso corporal medio  $200 \pm 10$  g. Fueron anestesiadas sumergiéndolas en un baño con 2-fenoxietanol para su peso y medida. Seguidamente se alojaron en tanques y fueron sometidas a un periodo de observación y aclimatación de 7 días con el fin de eliminar el anestésico y detectar cualquier signo clínico o comportamiento anómalo que hiciese sospechar de enfermedades que impedirían su inclusión en el protocolo experimental desarrollado. En el período de tiempo indicado no se observó en los peces ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión. Durante este periodo, a los peces se les suministró agua y

pienso sin medicar *ad libitum*. El pienso utilizado durante la experimentación fue específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición:

- Pienso sin medicar: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.

- Pienso medicado: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5%, aceite de soja 5% y flumequina en una concentración de 1,2 g flumequina/kg pienso.

Las condiciones del tanque (TP-1) donde se alojaron las doradas fueron:

#### Tanque TP-1

- Volumen del tanque: 10 m<sup>3</sup>
- Salinidad: 37 ‰
- Concentración de O<sub>2</sub>: 92 %
- Temperatura: 18 °C
- pH: 8

A los animales del Grupo 1 (180 doradas) se les administró oralmente vía pienso una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos. Antes de realizar el experimento se verificó la concentración de flumequina en el pienso medicado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El pienso medicado se suministró a los peces, siempre a la misma hora (8,00 h a.m.), constatándose que en un tiempo máximo de 15 minutos los peces consumen el pienso medicado (pellet) echado en el agua. La concentración del pienso administrado fue de

1,2 g flumequina/kg pienso. A cada dorada se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 1% del peso corporal medio, es decir, 2 g de pienso medicado/día, tomando como 200 g el peso corporal medio de la dorada, por lo tanto cada animal recibe oralmente 2,4 mg flumequina/200 g p.v./día, durante cinco días consecutivos.

Se eligió para el estudio la dosis de 12 mg flumequina/kg p.v./día durante 5 días por ser la que se ha recomendado inicialmente en piscifactoría, al objeto de obtener datos farmacocinéticos que puedan o no justificar cinetíficamente este tratamiento. La dosis de 12 mg flumequina/kg p.v. se inició en base a ensayos preliminares realizados por nuestro laboratorio con dosis de 5 mg/kg p.v. y 12 mg/kg p.v. que sugerían que al menos una dosis de 12 mg/kg era necesaria para alcanzar niveles sanguíneos terapéuticos.

**El 1º día de tratamiento (D1)** a los animales (180 doradas) se les administró oralmente 360 g de pienso medicado con flumequina (1,2 g flumequina/kg pienso). Se administraron 2 g de pienso medicado para cada animal (tomando el peso medio de cada animal 200 g) de forma que recibieron una dosis de 2,4 mg flumequina/pez (cantidad equivalente a una dosis de 12 mg/kg p.v.). Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Transcurrido este tiempo de 15 minutos se anestesiaron (2-fenoxi-etanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h y 12 h recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 doradas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 1ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

**El 2º día de tratamiento (D2)** se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxi-etanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 1ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (126 doradas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 12 mg/kg p.v. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (2ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 doradas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 2ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

**El 3º día de tratamiento (D3)** se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxi-etanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 2ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (102 doradas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 30 mg/kg p.v. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (3ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 doradas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 3ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

**El 4º día de tratamiento (D4)** se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 3ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (78 doradas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 12 mg/kg p.v. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (4ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad

de pienso medicado equivalente a una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 doradas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 4ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

**El 5º día de tratamiento (D5)** se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 4ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (54 doradas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 12 mg/kg p.v. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxi-etanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 12 h; y 24 h post-dosis (5ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo.

En la **Tabla 18** se describen los tiempos de dosificación y los tiempos acumulados y toma de muestra de sangre de los peces tratados.

Para la toma de muestras de sangre, con el fin de coger con facilidad a los peces, éstos fueron previamente anestesiados sumergiéndolos durante 2 minutos en un baño de agua de 2-fenoxietanol en una concentración de 15 ml/100 l de agua.

La muestra de sangre se recogió por punción en la vena caudal usando jeringas de 2 ml de volumen y agujas de 0,8 x 40 mm. Una vez anestesiados los peces, se

pesaron y se recogieron muestras de sangre individualmente en tubos heparinizados y debidamente etiquetados; seguidamente se centrifugaron las muestras a 10.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos y se aisló el plasma que se almacenó a -45 °C hasta el posterior análisis de la concentración de flumequina por HPLC.

**Tabla 18.** Dosificación y muestreo de sangre de 180 doradas tratadas con flumequina a dosis de 12 mg/kg p.v., durante cinco días consecutivos vía oral (pienso medicado)

	<b>Tiempo tras dosis (h)</b>	<b>Tiempo acumulado tras la 1ª dosis</b>	<b>Nº de Animal y muestra</b>					
<b>1º DIA de tratamiento</b>	1ª dosis		12 mg/kg p.v. vía pienso durante 15 min					
	0,5	0,5	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6
	1	1	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12
	2	2	T 13	T 14	T 15	T 16	T 17	T 18
	4	4	T 19	T 20	T 21	T 22	T 23	T 24
	6	6	T 25	T 26	T 27	T 28	T 29	T 30
	8	8	T 31	T 32	T 33	T 34	T 35	T 36
	10	10	T 37	T 38	T 39	T 40	T 41	T 42
	12	12	T 43	T 44	T 45	T 46	T 47	T 48
<b>2º DIA de tratamiento</b>	24	24	T 49	T 50	T 51	T 52	T 53	T 54
	2ª dosis		12 mg/kg p.v. vía pienso durante 15 min					
	4	28	T 55	T 56	T 57	T 58	T 59	T 60
	8	32	T 61	T 62	T 63	T 64	T 65	T 66
	12	36	T 67	T 68	T 69	T 70	T 71	T 72
<b>3º DIA de tratamiento</b>	24	48	T 73	T 74	T 75	T 76	T 77	T 78
	3ª dosis		12 mg/kg p.v. vía pienso durante 15 min					
	4	52	T 79	T 80	T 81	T 82	T 83	T 84
	8	56	T 85	T 86	T 87	T 88	T 89	T 90
	12	60	T 91	T 92	T 93	T 94	T 95	T 96
<b>4º DIA de tratamiento</b>	24	72	T 97	T 98	T 99	T 100	T 101	T 102
	4ª dosis		12 mg/kg p.v. vía pienso durante 15 min					
	4	76	T 103	T 104	T 105	T 106	T 107	T 108
	8	80	T 109	T 110	T 111	T 112	T 113	T 114
	12	84	T 115	T 116	T 117	T 118	T 119	T 120
<b>5º DIA de tratamiento</b>	24	96	T 121	T 122	T 123	T 124	T 125	T 126
	5ª dosis		12 mg/kg p.v. vía pienso durante 15 min					
	0,5	96,5	T 127	T 128	T 129	T 130	T 131	T 132
	1	97	T 133	T 134	T 135	T 136	T 137	T 138
	2	98	T 139	T 140	T 141	T 142	T 143	T 144
	4	100	T 145	T 146	T 147	T 148	T 149	T 150
	6	102	T 151	T 152	T 153	T 154	T 155	T 156
	8	104	T 157	T 158	T 159	T 160	T 161	T 162
	10	106	T 163	T 164	T 165	T 166	T 167	T 168
	12	108	T 169	T 170	T 171	T 172	T 173	T 174
24	120	T 175	T 176	T 177	T 178	T 179	T 180	

2.1.2. Estudio de distribución y depleción tisular en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)

Se seleccionaron 69 doradas sanas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) en buen estado nutricional de peso medio  $200 \pm 10$  g. Los peces fueron anestesiados con 2-fenoxietanol para su peso y medida. Se alojaron en tanques y fueron sometidos a un periodo de observación y aclimatación con el fin de eliminar el anestésico de 7 días y detectar cualquier signo clínico o comportamiento anómalo que hiciese sospechar de enfermedades que impedirían su inclusión en el protocolo experimental desarrollado. En el período de tiempo indicado no se observó en los peces ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión. Durante este periodo, a los peces se les suministró agua y pienso *ad libitum*. El pienso utilizado durante la experimentación fue específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición:

- Pienso sin medicar: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.

- Pienso medicado: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5%, aceite de soja 5% y flumequina en una concentración de 1,2 g flumequina/kg pienso.

Para el presente estudio, los peces del Grupo 2 (49 doradas) se dispusieron en un tanque (TP-2) cuyas condiciones fueron:

### Tanque TP-2

- Volumen del tanque: 10 m<sup>3</sup>
- Salinidad: 36 ‰
- Concentración de O<sub>2</sub>: 90 %
- Temperatura: 18 °C
- pH: 7,8

A los animales del Grupo 2 (49 doradas) se les administró oralmente una dosis de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos. Antes de realizar el experimento se verificó la concentración de flumequina en el pienso medicado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el pienso se suministró durante 15 minutos, siempre a la misma hora (8,00 h a.m.). La dosis de flumequina requerida de 12 mg/kg p.v./día se administró en forma de pienso medicado con una concentración de 1,2 g flumequina/kg pienso, recibiendo diariamente cada uno de los peces 2 g de pienso medicado (equivalente a 2,4 mg flumequina/pez/día). Se administraron 98 g de pienso medicado con flumequina/tanque/día, equivalente a 117,6 mg flumequina/49 peces/día, durante 5 días consecutivos. A cada dorada se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 1% del peso corporal medio, es decir, 2 g de pienso medicado/día, tomando como 200 g el peso corporal medio de la dorada de forma que recibe 12 mg flumequina/kg p.v.

Al final del tratamiento de 5 días de duración, se sacrificó a los animales sumergiéndolos en agua helada durante 5-10 min. Una vez confirmada la muerte, los peces fueron pesados, identificados individualmente y decapitados. Se extrajo piel y músculo, desechando cabeza, vísceras y espina dorsal. Se tomaron muestras de músculo + piel (en proporciones naturales) que fueron guardadas en bolsas etiquetadas. Dichas

muestras se congelaron a  $-45^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de flumequina por HPLC. Se sacrificaron 7 animales/tiempo a los siguientes intervalos de tiempo:

Tiempo 3 horas (0,125 días) tras la última dosis.

Tiempo 24 horas (1 día) tras la última dosis.

Tiempo 48 horas (2 días) tras la última dosis.

Tiempo 72 horas (3 días) tras la última dosis.

Tiempo 192 horas (8 días) tras la última dosis.

Tiempo 240 horas (10 días) tras la última dosis.

Tiempo 336 horas (14 días) tras la última dosis.

Los animales del Grupo 3 (20 doradas) (tanque TP-3) no recibieron tratamiento y fueron usados como control para determinar la validación del método analítico. Fueron alimentados con pienso específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.

Los peces del grupo 3 (20 doradas) se dispusieron en un tanque (TP-3) cuyas condiciones fueron:

#### Tanque TP-3

- Volumen del tanque:  $10\text{ m}^3$
- Salinidad:  $37\text{ ‰}$
- Concentración de  $\text{O}_2$ : 90 %
- Temperatura:  $18^{\circ}\text{C}$
- pH: 8

## 2.2. Ensayo analítico de flumequina en plasma y tejidos de doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)

Han sido publicados numerosos métodos analíticos para determinar las concentraciones de diferentes quinolonas en fluidos biológicos. En la literatura los primeros métodos descritos fueron fluorimétricos (MCHESNEY *et al.*, 1964; BRÜHL *et al.*, 1973) e implicaban una extracción diferencial. Estos primeros métodos no eran específicos y proporcionaban valores blancos relativamente altos y curvas de calibración no lineales. Posteriormente se utilizaron métodos de cromatografía de gases y cromatografía de capa fina (ROSEMBOOM *et al.*, 1979; WU *et al.*, 1980), pero su aplicación fue limitada únicamente a la determinación del ácido nalidíxico en plasma (ROSEMBOOM *et al.*, 1979; HUNDT Y BARLOW, 1981) y a la determinación del ácido piromidico tras un proceso de derivatización (WU *et al.*, 1980). Estos métodos cromatográficos más rápidos y precisos, vinieron también a competir con las técnicas de bioensayos no-específicas empleadas igualmente en la determinación de ciertas quinolonas (MURAYAMA *et al.*, 1981).

Más recientemente se empezaron a describir métodos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis de quinolonas en fluidos biológicos. Los métodos por HPLC abarcan desde ciertos procedimientos que implican un tiempo de realización bastante prologado por requerir un proceso de derivatización (SHARGEL y YU, 1973; SÖREL, y ROSEMBOOM, 1979) hasta otros métodos más rápidos, igualmente considerados de gran precisión, sensibilidad y reproducibilidad (MONTAY, *et al.*, 1985; MORTON *et al.*, 1986; HORII *et al.*, 1987; NILSSON-EHLE, 1987; SCHOLL *et al.*, 1987; LAGANA *et al.*, 1988; MANOHARAN *et al.*, 1988; GRIGGS Y WISE *et al.*, 1989; STRELEVITZ Y LINHARES, 1996; ROYBAL *et al.*,

1997; CARLUCCI, 1988; MARZO y DAL BO, 1998; ROSE *et al.*, 1998; GIGOSOS *et al.*, 2000).

También en base a la actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas, se han desarrollado ensayos microbiológicos (ATEF, *et al.*, 1987; WISE Y DONOVAN, 1987; WALKER *et al.*, 1992; MEINEN *et al.*, 1995; SHEM-TOV *et al.*, 1997). Sin embargo existen discrepancias entre los resultados obtenidos a través de ensayos microbiológicos y cromatográficos. En general las concentraciones obtenidas en los ensayos microbiológicos son mayores que las encontradas en los análisis cromatográficos, circunstancia atribuida a la actividad antimicrobiana del compuesto inalterado más las de los metabolitos activos, razón por la cual se considera que los ensayos cromatográficos son más selectivos y específicos en el análisis de fluoroquinolonas y la técnica recomendada para llevar a cabo estudios farmacocinéticos (WIGENDER *et al.*, 1984; JOOS *et al.*, 1985).

Con respecto al análisis de la flumequina, en la literatura se encuentran pocos métodos y en todos ellos se emplea como técnica analítica la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (HARRISON *et al.*, 1984; DECOLIN Y NICOLAS, 1987; GUYONET *et al.*, 1996; YORKE Y FROC, 2000; POULIQUEN Y MORVAN, 2002). Sin embargo HARRISON *et al.*, (1984). Determinaron flumequina mediante métodos microbiológicos. Tras el estudio de los métodos útiles descritos para la cuantificación de flumequina, hemos podido constatar en nuestro laboratorio que la cuantificación óptima se obtuvo empleando una columna en fase reversa usando una fase móvil que incluye ácido ortofosfórico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, buffer de pH 9,1, ácido clorhídrico y trietilamina. Según lo anteriormente expuesto, hemos seleccionado para el análisis de flumequina en muestras plasmáticas y tisulares el procedimiento de extracción y las

condiciones cromatográficas descritas por YORKE Y FROC (2000). Este método de análisis demostró ser lineal, reproducible y sensible para el estudio de niveles de flumequina en plasma y tejidos.

### 2.2.1. Procedimiento de extracción de flumequina. Condiciones cromatográficas

El método de extracción con el que se procesaron las muestras plasmáticas fue el siguiente: se tomó cada muestra de plasma y se midió el volumen de cada una de ellas, se les añadió 0,3 ml de HCl 0,6M agitándose suavemente durante 1 minuto utilizando un agitador Heidolph Reax 2000.

Para las muestras de tejido, la extracción de flumequina se realizó tomando 2 g de muestra de tejido (músculo + piel en condiciones naturales) procedente de un animal tratado que se homogenizaron en 5 ml de agua ultrapura Milli-Q por tratamiento ultrasónico en un homegenizador ultrasónico Labsonic U Braun 2000 durante 10 minutos a 3000 rpm y se recogió el sobrenadante.

El plasma y el sobrenadante obtenido en el caso de las muestras tisulares se procesaron de la siguiente forma en ambos casos: al plasma y al sobrenadante se les añadió 5 ml de acetato de etilo, a continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recogió la fase orgánica de acetato de etilo que fue transferida a un matraz topacio. El procedimiento de extracción con acetato de etilo se realizó tres veces. Se recogieron los tres extractos de acetato de etilo obtenidos que se combinaron en el mismo matraz y se evaporó el extracto final en corriente de nitrógeno a 30°C. El extracto seco, residuo resultante, se disolvió en 2ml de fase móvil en el caso de las muestras tisulares y 1 ml en el caso de las muestras plasmáticas. El eluyente se recogió

en viales de vidrio topacio y una alícuota de 20 µl se inyectó en el sistema cromatográfico de HPLC para el análisis de flumequina.

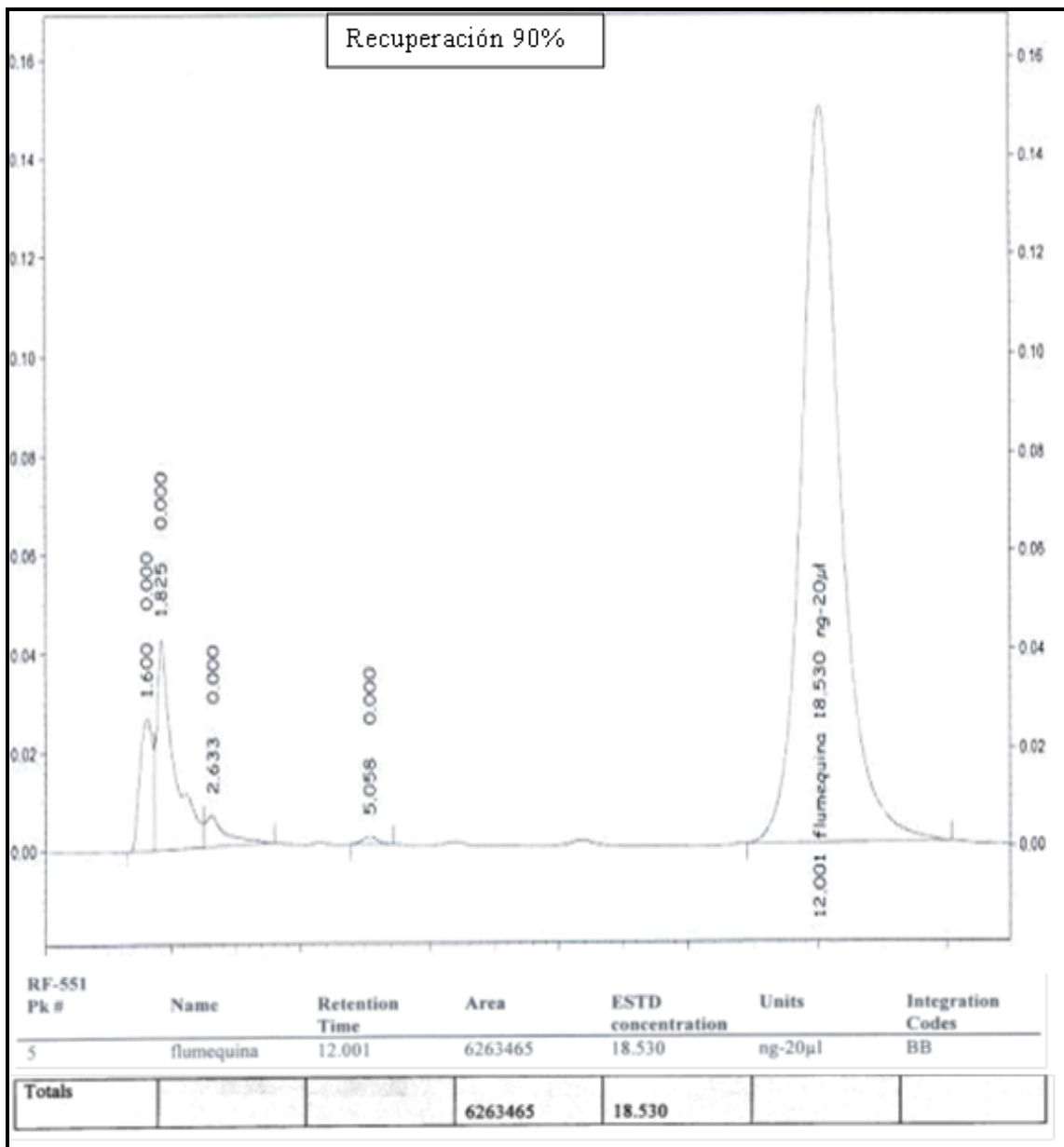
El sistema cromatográfico líquido de alta eficacia utilizado fue un SHIMADZU modelo LC-10AS, equipado con detector de fluorescencia SHIMADZU modelo RF-551, bomba modelo LC-10AS y sistema de procesamiento de datos SHIMADZU CHROMATOPAC R-6A, y una columna cromatográfica (SCHARLAU) PLRP-S de fase reversa 100Å (150 x 4,6 cm, tamaño de partícula 5 µm). El detector fluorimétrico se fijó a una longitud de onda de excitación de 312 nm y de emisión de 366 nm. Para el análisis cuantitativo de flumequina en las muestras plasmáticas y tisulares, se preparó una fase móvil compuesta de ácido ortofosfórico 0,02 M (720 ml), acetonitrilo (160 ml) y tetrahidrofurano (120 ml). El flujo se mantuvo a una velocidad de 1 ml/min.

Las áreas de los picos en los cromatogramas de las muestras se cuantificaron usando la técnica del estándar externo por el uso de soluciones estándar de referencia de flumequina. La solución stock de los estándares de referencia se preparó disolviendo 10 mg de flumequina en 10 ml de una mezcla 50:50 de NaOH 1M y metanol almacenando en la oscuridad a -45° C. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente a partir de estas soluciones stock diluidas en buffer Tris-hidroximetil-aminometano pH 9,1.

El buffer Tris-hidroximetil-aminometano pH 9,1 se preparó disolviendo 3,025 g de Tris-hidroximetil-aminometano en 240 µl de ácido clorhídrico al 37% de riqueza y enrasando en un matraz aforado hasta 500 ml con agua ultrapura Milli-Q.

Las curvas de calibrado para la flumequina fueron lineales en un rango de 0,001-20 µg/ml para plasma y en un rango de 0,001-20 µg/g para músculo+piel en proporciones naturales, el coeficiente de correlación R fue de 0,9999. La recuperación media de flumequina en los tejidos estudiados fue >90%. La precisión intra-día e inter-

día presentaron un coeficiente de variación < 5,5%. No existió ninguna interferencia con los compuestos endógenos propios del tejido estudiado lo que evidencia la especificidad del método. El límite de cuantificación fue para plasma 0,001 µg/ml y para músculo+piel 0,001 µg/g. El método utilizado fue específico para las sustancias analizadas y no se observó en el cromatograma (**Figura 5**) ninguna interferencia con las sustancias endógenas propias de los fluidos y tejidos estudiados.



**Figura 5.** Cromatograma de una muestra de músculo + piel blanco enriquecido con 1 µg/g de flumequina, 1 g de tejido se enriquece con 1 ml de 1 µg/ml de flumequina y se extraen en un volumen final de 1 ml. El volumen de inyección es de 20 µl.

### 2.3. Análisis de datos

La curva de las concentraciones medias plasmáticas de flumequina obtenidas tras la administración oral múltiple de 12 mg flumequina/kg p.v. se fijaron secuencialmente a un modelo compartimental, monocompartimental, bicompartimental y múltiple por el uso del programa WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo elegido fue aquél que obtuviera el valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (YAMAOKA *et al.*, 1978). El modelo bicompartimental fue el mejor estimado. Este modelo fue utilizado para establecer los parámetros farmacocinéticos. Las curvas de las concentraciones plasmáticas vs tiempo declinaron biexponencialmente y los datos se ajustaron a la siguiente ecuación (WAGNER, 1975; 1976):

$$C_p = A_1 \times e^{-\alpha t} + A_2 \times e^{-\beta t} - A_3 \times e^{-K_a t} \quad (\text{vía oral})$$

Siendo:

$C_p$  Concentración plasmática del fármaco.

$A_1, A_2, A_3$  Coeficientes matemáticos, (es decir  $A_1$  y  $A_2$  son las concentraciones plasmáticas extrapoladas tiempo cero de la primera y segunda fase de eliminación del fármaco y  $A_3$  de la fase de absorción).

$\alpha$  Constante híbrida de la fase inicial de distribución.

$\beta$  Constante híbrida de la fase terminal de eliminación.

$K_a$  Constante de absorción, constante de primer orden.

$t$  Tiempo.

El modelo farmacocinético bicompartimental considera al organismo dividido en dos compartimientos: central y periférico.

El compartimiento central está formado por el plasma, los fluidos intersticiales y el agua intracelular asequible (tejidos bien irrigados). Por definición, la distribución de un medicamento en todos los elementos del compartimiento central sería instantánea, y su concentración uniforme e igual a la existente en el plasma. Por otro lado, el compartimiento periférico lo constituyen el agua intracelular profunda (tejidos poco vascularizados) y los depósitos no acuosos (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos intracelulares). En este caso, un fármaco accedería a este compartimiento más lentamente desde el plasma, transcurriendo un tiempo antes de la consecución del equilibrio de la concentración del fármaco en el organismo.

En el seno del compartimiento central se materializan los procesos de eliminación del fármaco por metabolismo y excreción, regidos por una constante de eliminación ( $K_{10}$ ). Este compartimiento canalizaría además el proceso de distribución de fármaco al compartimiento periférico ( $K_{12}$ ), y en el caso de administración extravasal, también el proceso de absorción, caracterizado por la constante de absorción ( $K_a$ ).

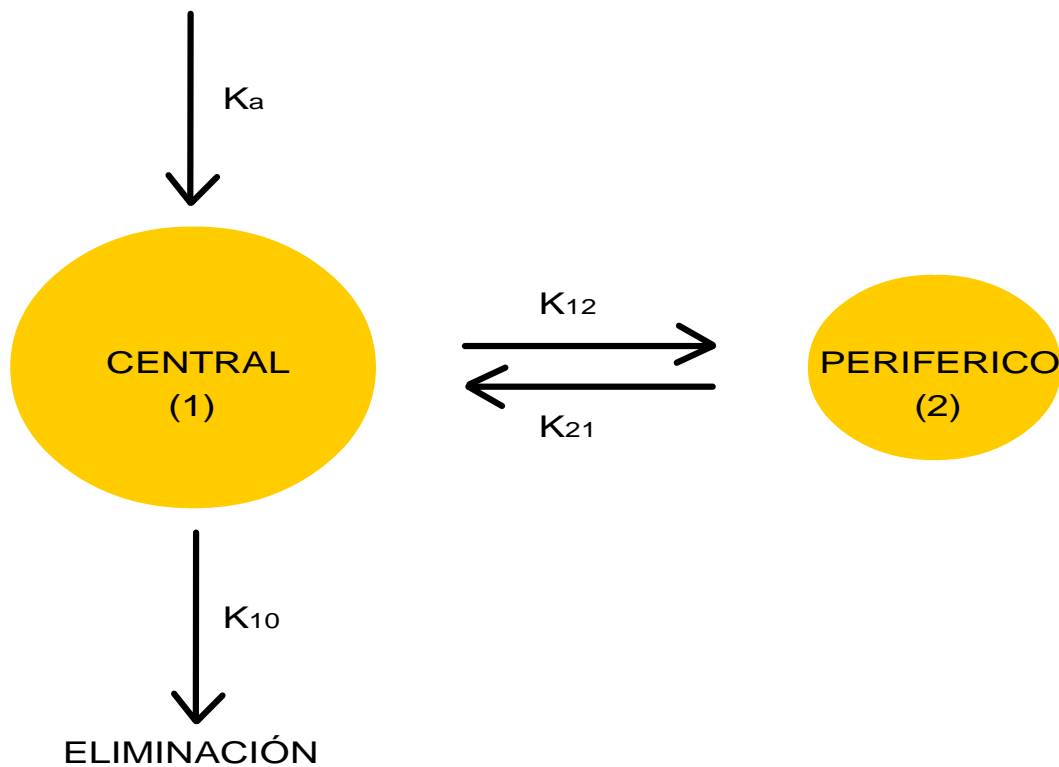
En el compartimiento periférico, desprovisto de mecanismos metabólicos y excretores de importancia, el fármaco permanece depositado pasivamente y su retorno al plasma (regido por la constante de retorno  $K_{21}$ ) depende del grado de eliminación del compartimiento central y de la afinidad que presente el fármaco hacia los depósitos no acuosos.

Aunque la velocidad de acceso del fármaco a los diferentes elementos del compartimiento periférico no es la misma y la velocidad de retorno al compartimiento central tampoco lo es, en la práctica los retrasos en la distribución y en el retorno se consideran aditivos y están cuantificados globalmente por las constantes  $K_{12}$  y  $K_{21}$ . Del

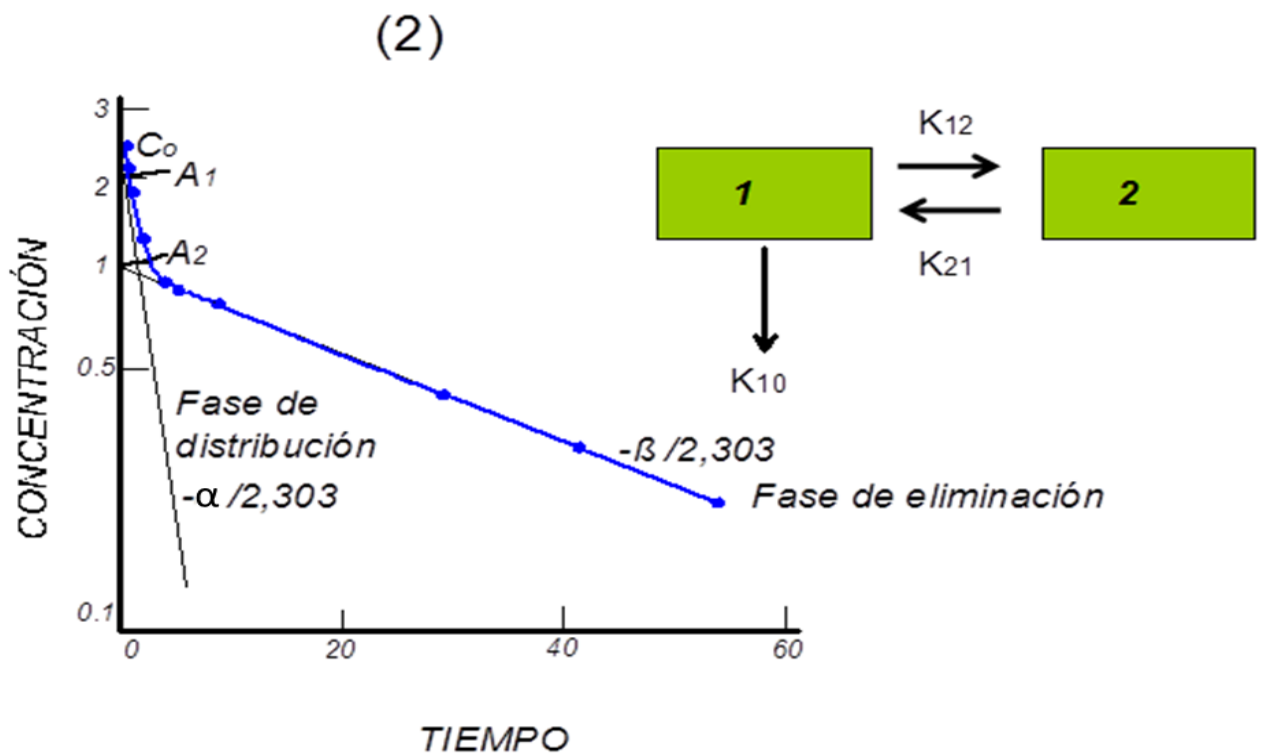
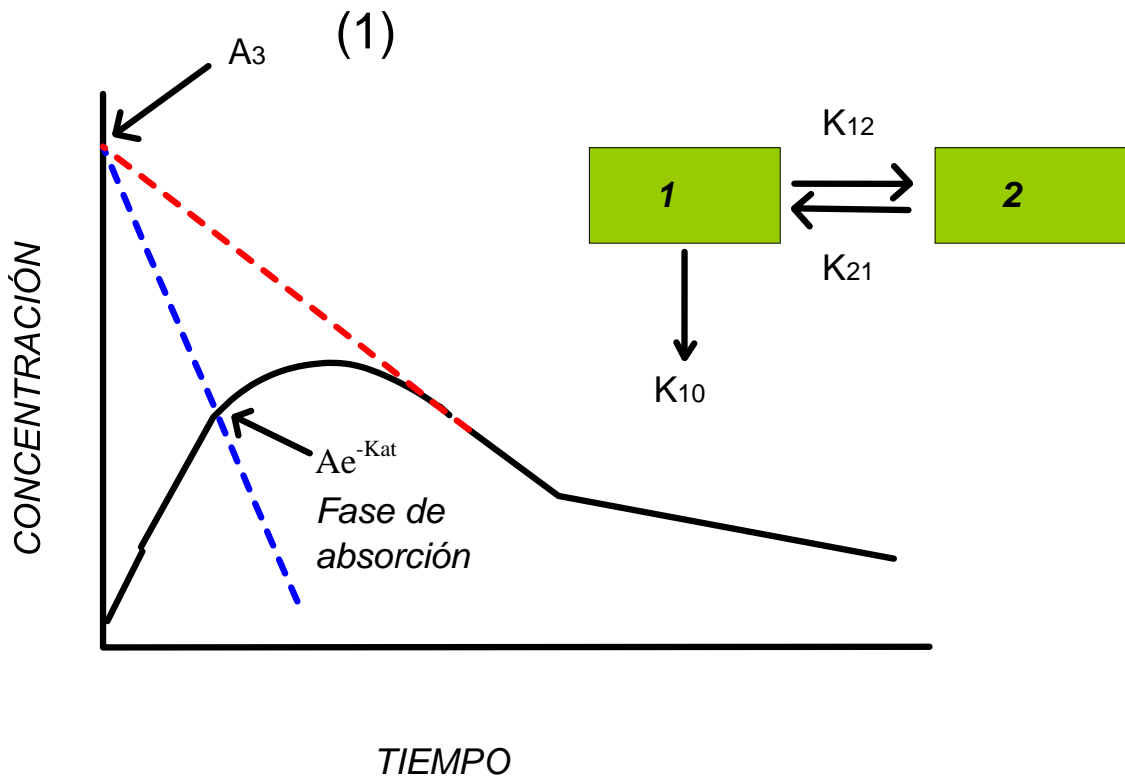
mismo modo, la constante de absorción ( $K_a$ ) engloba las de liberación y absorción, y la constante de eliminación ( $K_{10}$ ) engloba las de metabolismo y excreción.

Se asume que los procesos de distribución y eliminación asociados con este modelo obedecen a cinéticas de primer orden (**Figura 6**), lo que significa que la velocidad con la que un fármaco se absorbe y se elimina a partir del compartimiento central es proporcional a la concentración del fármaco en dicho compartimiento.

Las curvas concentración-tiempo (**Figura 7**), presentadas en forma semilogarítmica, demuestran una fase de absorción en la concentración plasmática del fármaco (1) y una fase de eliminación (2) en la concentración plasmática del fármaco que principalmente se debe a una distribución (por difusión pasiva) del fármaco desde el compartimiento central al compartimiento periférico. Una vez se ha alcanzado un equilibrio de pseudo-distribución, la velocidad de eliminación en la concentración plasmática se reduce y viene determinada principalmente por la eliminación del fármaco del compartimiento central. Esta porción terminal lineal de la curva de disposición se denomina fase  $\beta$  de “eliminación” y a partir de su pendiente ( $-\beta/2,303$ ) se deriva la semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) del fármaco. Resolviendo la curva de disposición en sus componentes por el método de residuales, se obtienen los segmentos lineales denominados fase de “absorción” y fase de “distribución” (GIBALDI *et al.*, 1969; WAGNER, 1975; 1976).



**Figura 6.** Diagrama esquemático de un modelo abierto bicompartimental. El fármaco, una vez localizado en el compartimiento central se distribuye instantáneamente. La distribución entre el compartimiento central y el compartimiento periférico tiene lugar más lentamente;  $K_{12}$ ,  $K_{21}$ , son constantes de primer orden para la transferencia del fármaco entre los dos compartimientos. La eliminación se asume que tiene lugar exclusivamente desde el compartimiento central;  $K_{10}$  es una constante de primer orden para la eliminación del fármaco a partir del compartimiento central



**Figura 7.** Distintas fases de los perfiles de concentración plasmática de un fármaco tras administración de una dosis oral (1) e intravenosa (2)

En los estudios de disposición, los coeficientes  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  y las constantes de disposición  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $K_a$  se calculan a partir de datos experimentales por análisis de regresión por mínimos cuadrados y se usan para calcular los diferentes parámetros farmacocinéticos asociados con el modelo bicompartimental, como indicamos a continuación.

Los parámetros farmacocinéticos investigados tras la administración oral del fármaco flumequina fueron:

$A_1, A_2, A_3$  Concentraciones del fármaco extrapoladas a tiempo 0.

$\alpha$  y  $\beta$  Constantes de disposición. Ambas son constantes híbridas y respectivamente gobiernan en conjunto los procesos de distribución del fármaco al compartimiento periférico, de retorno al central y de eliminación del mismo por biotransformación y excreción.

$K_a$  Constante de absorción.

$t_{1/2\alpha}$  Semivida plasmática para la fase inicial de distribución ( $\alpha$ ).

$t_{1/2\beta}$  Semivida plasmática para la fase terminal de eliminación ( $\beta$ ).

$t_{1/2a}$  Semivida plasmática de absorción.

AUC Área bajo la curva concentración vs tiempo

$$AUC = \frac{A_1}{\alpha} + \frac{A_2}{\beta} - \frac{A_3}{K_a}$$

CL Aclaramiento plasmático total ("Clearance")

$$CL = \frac{\text{Dosis} \times F}{AUC}$$

**V<sub>1</sub>** Volumen de distribución en el compartimiento central\*

$$V_1 = (\text{dosis kg}^{-1})(F) / A_1 + A_2$$

**V<sub>2</sub>** Volumen aparente de distribución en el compartimiento secundario\*

$$V_2 = (V_1)(F) \times (K_{12}/K_{21})$$

**K<sub>12</sub>** Constante de distribución desde el compartimiento central al compartimiento periférico

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

**K<sub>21</sub>** Constante de retorno desde el compartimiento periférico al compartimiento central

$$K_{21} = \frac{(A_1 \beta K_a + A_2 \alpha K_a - A_3 \alpha \beta)}{A_1 (K_a - \alpha) + A_2 (K_a - \beta)}$$

**K<sub>10</sub>** Constante de eliminación.

$$K_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{K_{21}}$$

**T<sub>max</sub>** Tiempo necesario para alcanzar la C<sub>max</sub>.

**C<sub>max</sub>** Concentración máxima en plasma tras administración oral.

## 2.4. Fármacos y reactivos

- Acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$  CAS: 141-78-6) Ref: AC01542500 (Sharlau)
- Acetonitrilo ( $CH_3CN$ , Grado HPLC) Ref: AC03292500 (Sharlau)
- Ácido clorhídrico 37% ( $HCl$  CAS: 7647-01-0) Ref: AC07301000 (Sharlau).
- Ácido ortofosfórico 85% ( $H_3PO_4$  CAS: 7664-38-2) Ref: AC1098005P (Sharlau).
- Hidróxido sódico ( $OHNa$  CAS: 1310-73-2) (Merck)
- 2-Fenoxi-etanol ( $C_8H_{10}O_2$  CAS: 122-99-6) Ref: FE05251000 (Sharlau)
- Flumequina ( $C_{14}H_{12}FNO_3$  CAS: 42835-25-6) Ref: F-7016 (Sigma)
- Flumequina, pureza 99,95% ( $C_{14}H_{12}FNO_3$  CAS: 42835-25-6) Ref: 2010405  
(Laboratorios Impex Química, S.A.)
- Metanol ( $CH_3OH$  CAS: 67-56-1, Grado HPLC) Ref: ME03062500 (Sharlau)
- Tetrahidrofurano ( $C_4H_8O$  CAS: 109-99-9, Grado HPLC) Ref: TE02252500 (Sharlau)
- Trietilamina [ $N(CH_2CH_3)_3$ ] Ref: 808352 (Merck)
- Tris-hidroximetil-aminometano [ $(HOCH_2)_3CNH_2$ ] Ref: 1.08382.0500 (Merck)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Farmacocinética de flumequina tras administración única oral en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)

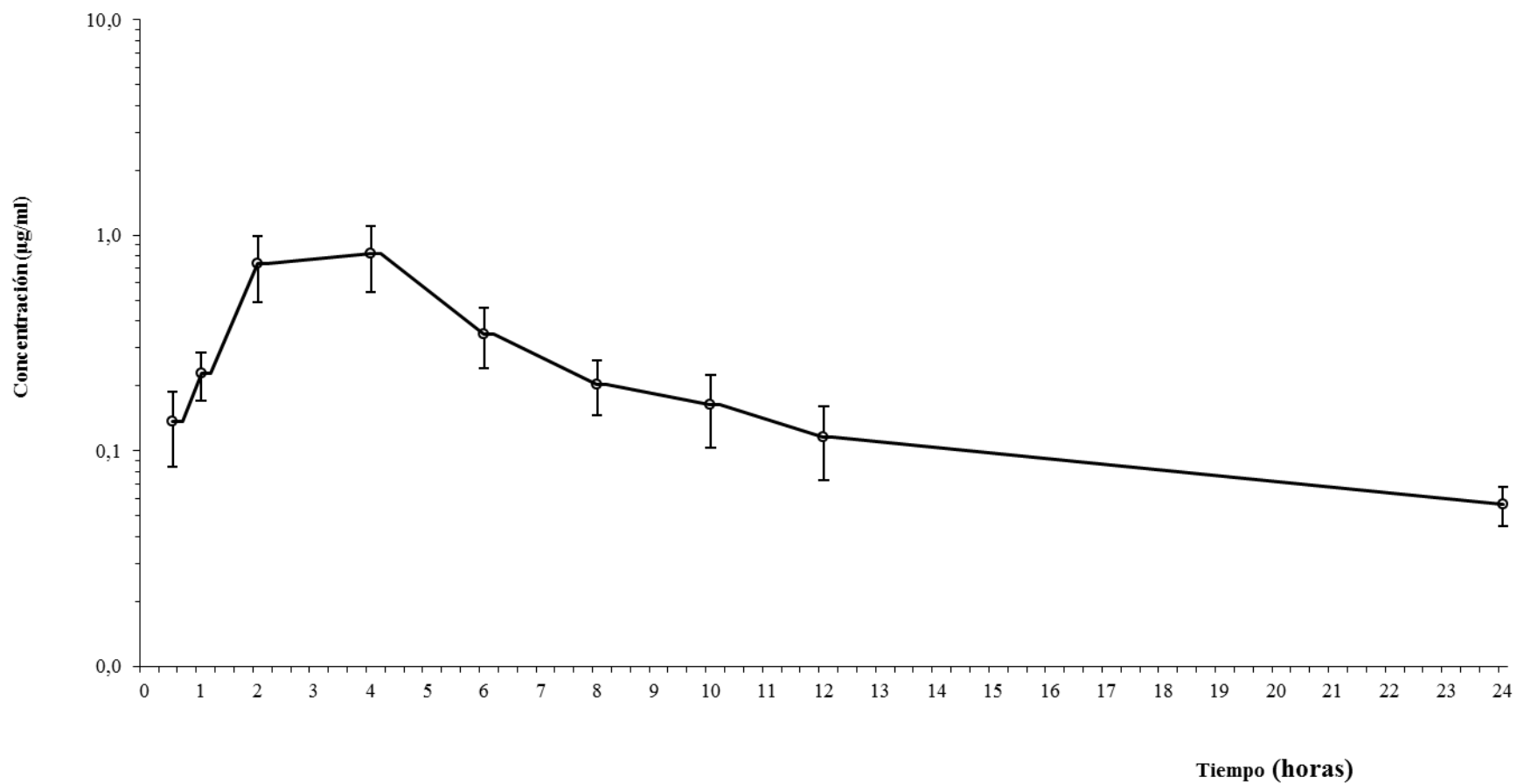
##### 3.1.1. Niveles plasmáticos de flumequina tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de flumequina obtenidos en doradas tras la administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v. se representan en la **Tabla 19**. La **Figura 8** ilustra los niveles plasmáticos medios de flumequina frente al tiempo, calculados tras administración oral de 12 mg flumequina/kg p.v. en doradas.

**Tabla 19.** Niveles plasmáticos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de flumequina tras administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v. en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>								
<b>TIEMPO (h)</b>	<b>ANIMALES (54 doradas) (n° identificación)</b>	<b>Flumequina (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>						<b>Valor medio (n=6) <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	0,079	0,082	0,207	0,115	0,164	0,167	0,136 $\pm$ 0,052
1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	0,216	0,222	0,296	0,293	0,190	0,152	0,228 $\pm$ 0,057
2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	0,475	0,554	1,050	0,873	0,948	0,525	0,738 $\pm$ 0,248
4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	0,890	1,188	0,436	0,999	0,571	0,852	0,823 $\pm$ 0,277
6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	0,247	0,274	0,555	0,321	0,362	0,338	0,349 $\pm$ 0,109
8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	0,183	0,289	0,181	0,160	0,185	0,158	0,193 $\pm$ 0,049
10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	0,210	0,114	0,107	0,238	0,204	0,108	0,164 $\pm$ 0,060
12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	0,064	0,094	0,130	0,193	0,101	0,116	0,116 $\pm$ 0,044
24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	0,051	0,042	0,057	0,059	0,076	0,052	0,056 $\pm$ 0,011

SD: Desviación estándar



**Figura 8.** Niveles medios plasmáticos (µg/ml) de flumequina tras administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v. en doradas. Cada punto representa el valor medio de 6 animales; las barras verticales corresponden a la desviación estándar

### 3.1.2. Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de flumequina vs tiempo obtenidos tras administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v., se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple-modelo compartimental usando el programa WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (YAMAOKA *et al.*, 1978). La curva de las concentraciones plasmáticas de flumequina frente al tiempo tras administración única oral obtenida, se ajustó adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético de acuerdo a la siguiente ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-K_a t}$$

donde C es la concentración plasmática de flumequina;  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  son coeficientes matemáticos;  $\alpha$  es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución,  $\beta$  es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal y  $K_a$  es la constante de velocidad de absorción, constante de primer orden. Los valores de los parámetros farmacocinéticos de la flumequina calculados a partir de la administración única oral de 12 mg flumequina/ kg p.v. se presentan en la **Tabla 20**.

Tras la administración oral de flumequina (**Tabla 20**) se observó que el fármaco fue absorbido y más lentamente eliminado obteniéndose una semivida de absorción ( $t_{1/2a}$ ) de 1,379 h, y alcanzando una concentración máxima ( $C_{max}$ ) de 0,586  $\mu\text{g/ml}$  en un tiempo ( $T_{max}$ ) de 2,472 h. Tras la administración única oral de flumequina se observó un valor de la semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de 18,788 h.

**Tabla 20.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v. en doradas

<b>Parámetro*</b>	
$A_1$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	4,458
$A_2$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,124
$A_3$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	4,582
$\alpha$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,368
$\beta$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,037
$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,503
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,379
$t_{1/2\beta}$ (h)	1,883
$t_{1/2\beta}$ (h)	18,788
$K_{12}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,133
$K_{21}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,066
$K_{10}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,206
AUC ( $\text{mg l}^{-1}\text{h}$ )	6,358
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,586
$T_{\text{max}}$ (h)	2,472

\* Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

### **3.2. Farmacocinética de flumequina tras administración múltiple oral de flumequina durante 5 días en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)**

#### ***3.2.1. Niveles plasmáticos de flumequina tras administración múltiple oral***

Los niveles plasmáticos de flumequina obtenidos en cada animal tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día durante 5 días consecutivos se representan en la **Tabla 21** y **Tabla 22**. Las **Figuras 9** y **10** ilustran los niveles plasmáticos medios de flumequina frente al tiempo, tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día durante 5 días consecutivos.

**Tabla 21.** Niveles plasmáticos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de flumequina tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos en doradas

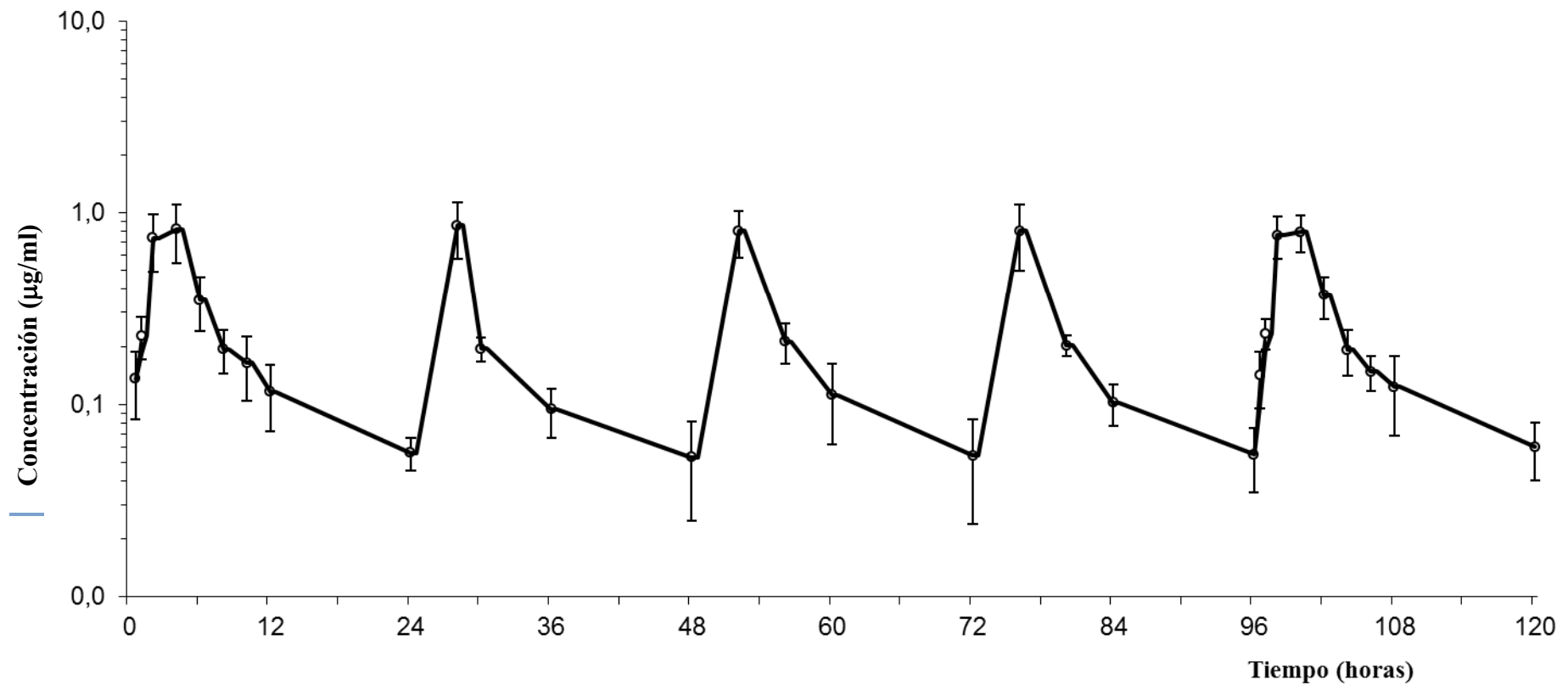
GRUPO 1 TRATADO								
Tiempo tras dosis D1,D2,D3,D4, D5 (h)	Tiempo acumulado tras la primera dosis (h)	Animales (180 doradas) (n° identificación)	Flumequina ( $\mu\text{g/ml}$ )					
0,5 h-D1	0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	0,079	0,082	0,207	0,115	0,164	0,167
1 h-D1	1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	0,216	0,222	0,296	0,293	0,190	0,152
2 h-D1	2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	0,475	0,554	1,050	0,873	0,948	0,525
4 h-D1	4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	0,890	1,188	0,436	0,999	0,571	0,852
6 h-D1	6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	0,247	0,274	0,555	0,321	0,362	0,338
8 h-D1	8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	0,183	0,289	0,181	0,160	0,185	0,158
10 h-D1	10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	0,210	0,114	0,107	0,238	0,204	0,108
12 h-D1	12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	0,064	0,094	0,130	0,193	0,101	0,116
24 h-D1	24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	0,051	0,042	0,057	0,059	0,076	0,052
4 h-D2	28	T55,T56,T57,T58,T59,T60	0,528	0,89	1,371	0,757	0,764	0,831
8 h-D2	32	T61,T62,T63,T64,T65,T66	0,164	0,218	0,174	0,229	0,207	0,173
12 h-D2	36	T67,T68,T69,T70,T71,T72	0,064	0,118	0,074	0,129	0,107	0,073
24 h-D2	48	T73,T74,T75,T76,T77,T78	0,092	0,087	0,038	0,032	0,032	0,038
4 h-D3	52	T79,T80,T81,T82,T83,T84	0,954	1,104	0,816	0,606	0,509	0,826
8h-D3	56	T85,T86,T87,T88,T89,T90	0,266	0,261	0,239	0,154	0,191	0,160
12 h-D3	60	T91,T92,T93,T94,T95,T96	0,166	0,161	0,139	0,054	0,091	0,06
24 h-D3	72	T97,T98,T99,T100,T101,T102	0,028	0,025	0,103	0,041	0,072	0,056
4 h-D4	76	T103,T104,T105,T106,T107,T108	0,901	0,772	0,641	0,593	0,550	1,363
8 h-D4	80	T109,T110,T111,T112,T113,T114	0,208	0,238	0,178	0,196	0,172	0,220
12 h-D4	84	T115,T116,T117,T118,T119,T120	0,108	0,138	0,078	0,096	0,072	0,120
24 h D4	96	T121,T122,T123,T124,T125,T126	0,086	0,060	0,056	0,042	0,027	0,056
0,5 h-D5	96,5	T127,T128,T129,T130,T131,T132	0,085	0,123	0,102	0,184	0,199	0,154
1 h-D5	97	T133,T134,T135,T136,T137,T138	0,198	0,302	0,270	0,211	0,201	0,220
2 h-D5	98	T139,T140,T141,T142,T143,T144	0,976	0,632	1,003	0,540	0,790	0,650
4 h-D5	100	T145,T146,T147,T148,T149,T150	0,923	0,732	0,822	0,503	0,989	0,802
6 h-D5	102	T151,T152,T153,T154,T155,T156	0,334	0,539	0,402	0,301	0,289	0,355
8 h-D5	104	T157,T158,T159,T160,T161,T162	0,287	0,177	0,183	0,154	0,144	0,205
10 h-D5	106	T163,T164,T165,T166,T167,T168	0,202	0,113	0,147	0,149	0,154	0,125
12 h-D5	108	T169,T170,T171,T172,T173,T174	0,076	0,189	0,190	0,098	0,072	0,115
24 h-D5	120	T175,T176,T177,T178,T179,T180	0,088	0,047	0,064	0,075	0,045	0,038

D1: día 1; D2: día 2; D3: día 3; D4: día 4; D5: día 5

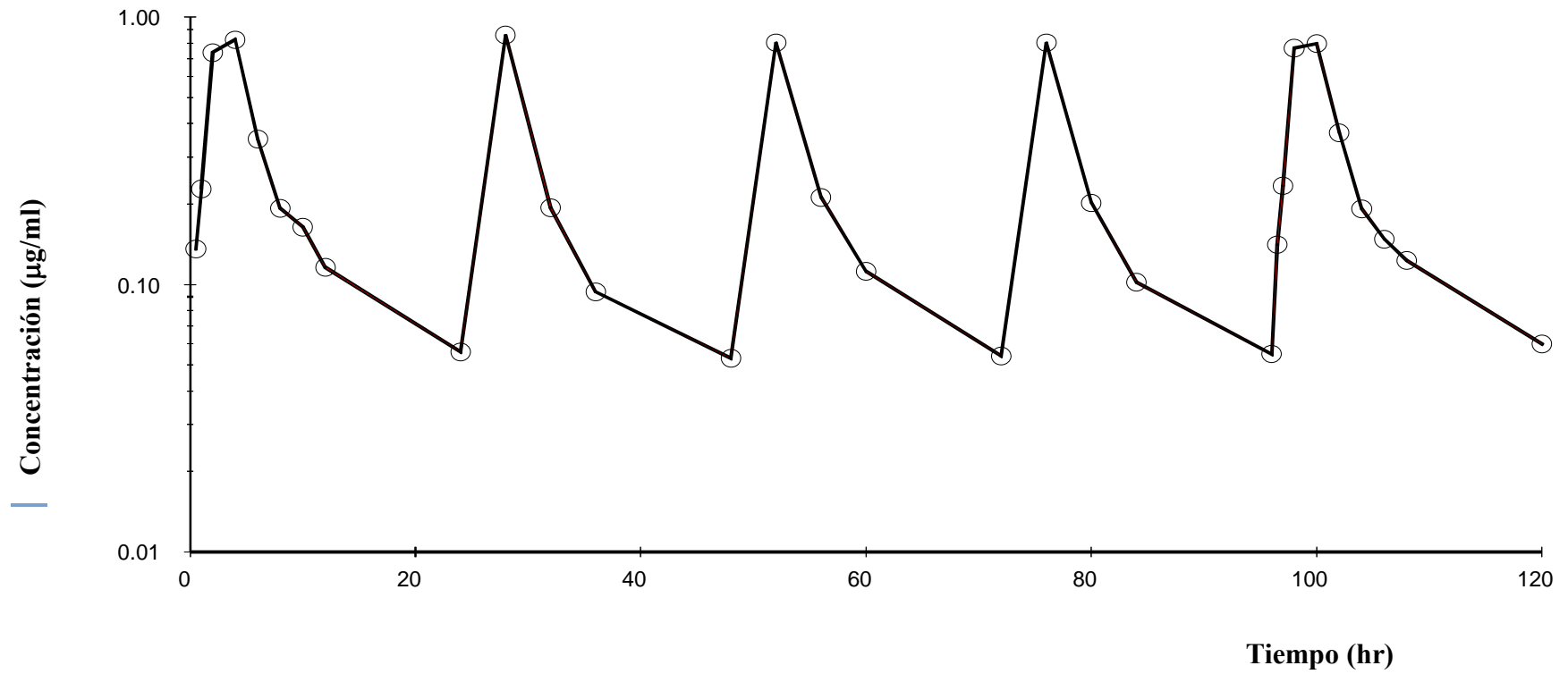
**Tabla 22.** Niveles medios plasmáticos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de flumequina tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>			
<b>Tiempo tras dosis D1,D2,D3,D4,D5 (h)</b>	<b>Tiempo acumulado tras la primera dosis (h)</b>	<b>Animales (n° identificación)</b>	<b>Valor medio (n=6) <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
0,5 h-D1	0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	0,136 $\pm$ 0,052
1 h-D1	1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	0,228 $\pm$ 0,057
2 h-D1	2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	0,738 $\pm$ 0,248
4 h-D1	4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	0,823 $\pm$ 0,277
6 h-D1	6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	0,350 $\pm$ 0,109
8 h-D1	8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	0,193 $\pm$ 0,049
10 h-D1	10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	0,164 $\pm$ 0,060
12 h-D1	12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	0,116 $\pm$ 0,044
24 h-D1	24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	0,056 $\pm$ 0,011
4 h-D2	28	T55,T56,T57,T58,T59,T60	0,857 $\pm$ 0,280
8 h-D2	32	T61,T62,T63,T64,T65,T66	0,194 $\pm$ 0,027
12 h-D2	36	T67,T68,T69,T70,T71,T72	0,094 $\pm$ 0,027
24 h-D2	48	T73,T74,T75,T76,T77,T78	0,053 $\pm$ 0,028
4 h-D3	52	T79,T80,T81,T82,T83,T84	0,803 $\pm$ 0,219
8h-D3	56	T85,T86,T87,T88,T89,T90	0,212 $\pm$ 0,050
12 h-D3	60	T91,T92,T93,T94,T95,T96	0,112 $\pm$ 0,050
24 h-D3	72	T97,T98,T99,T100,T101,T102	0,054 $\pm$ 0,030
4 h-D4	76	T103,T104,T105,T106,T107,T108	0,803 $\pm$ 0,303
8 h-D4	80	T109,T110,T111,T112,T113,T114	0,202 $\pm$ 0,025
12 h-D4	84	T115,T116,T117,T118,T119,T120	0,102 $\pm$ 0,025
24 h D4	96	T121,T122,T123,T124,T125,T126	0,055 $\pm$ 0,020
0,5 h-D5	96,5	T127,T128,T129,T130,T131,T132	0,141 $\pm$ 0,046
1 h-D5	97	T133,T134,T135,T136,T137,T138	0,234 $\pm$ 0,042
2 h-D5	98	T139,T140,T141,T142,T143,T144	0,765 $\pm$ 0,191
4 h-D5	100	T145,T146,T147,T148,T149,T150	0,795 $\pm$ 0,170
6 h-D5	102	T151,T152,T153,T154,T155,T156	0,370 $\pm$ 0,092
8 h-D5	104	T157,T158,T159,T160,T161,T162	0,192 $\pm$ 0,051
10 h-D5	106	T163,T164,T165,T166,T167,T168	0,148 $\pm$ 0,031
12 h-D5	108	T169,T170,T171,T172,T173,T174	0,123 $\pm$ 0,054
24 h-D5	120	T175,T176,T177,T178,T179,T180	0,060 $\pm$ 0,020

D1: día 1; D2: día 2; D3: día 3; D4: día 4; D5: día 5; SD: desviación estándar



**Figura 9.** Niveles medios plasmáticos (µg/ml) de flumequina tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/ kg p,v./día durante 5 días consecutivos en doradas, Cada punto representa el valor medio de 6 animales; las barras verticales corresponden a la desviación estándar



**Figura 10.** Niveles medios plasmáticos de flumequina en doradas tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos (Figura obtenida con el programa WinNolin)

### 3.2.2. Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras administración múltiple oral

Los niveles medios plasmáticos de flumequina obtenidos tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple- modelo compartimental usando el programa WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (YAMAOKA *et al.*, 1978). Las curvas de disposición plasmática de flumequina tras administración oral múltiple se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético de acuerdo a la siguiente ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-K_a t}$$

donde C es la concentración plasmática de flumequina;  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  son coeficientes matemáticos;  $\alpha$  es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución,  $\beta$  es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal y  $K_a$  es la constante de velocidad de absorción, constante de primer orden. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos y estimados en el primer día (D1) y en la última administración (D5) tras administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día se presentan en las **Tabla 23** y **Tabla 24** respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos estimados para todo el periodo completo de dosis múltiple oral (5 días) se presentan en la **Tabla 25**.

Los parámetros farmacocinéticos de flumequina obtenidos a partir de los niveles medios plasmáticos tras la administración oral para el primer día de dosificación, para el

quinto día de dosificación y para el periodo completo de dosificación se representan en la **Tabla 26**.

Los parámetros  $t_{1/2\beta}$  y AUC fueron similares en el primer día, quinto día y periodo completo de tratamiento, por lo que se sugiere que no existe acumulación del fármaco ni una saturación en su eliminación originada por el tratamiento prolongado. La semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) tras el primer día de tratamiento alcanza valores de 18,788 h y tras el quinto día de tratamiento 23,491 h, algo más prolongado pero no estadísticamente significativo por la variabilidad en los niveles plasmáticos a las 24 h (valores de 0,051/ 0,042/ 0,057/ 0,059/ 0,076/ 0,052 con un valor medio de  $0,056 \pm 0,011$  a las 24 h tras la primera dosis frente a 0,088/ 0,047/ 0,064/ 0,075/ 0,045/ 0,038 con un valor medio de  $0,060 \pm 0,020$  a las 24 h tras la quinta dosis).

La absorción oral queda reflejada en la semivida de absorción  $t_{1/2a}$  de 1,542 h para el periodo completo de dosificación. Tras la administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día se obtuvo una concentración máxima ( $C_{max}$ ) de 0,621  $\mu\text{g/ml}$  en un tiempo ( $T_{max}$ ) de 2,573 h. Tras la administración múltiple oral, la flumequina se elimina más lentamente del organismo, siendo la semivida plasmática de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de 18,396 h detectándose niveles plasmáticos del antimicrobiano hasta 24 horas post administración en un rango de 0,038 a 0,088  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 23.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras el primer día (1ª dosis) de la administración oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>	
<b>Primer día de administración (54 doradas)</b>	
<b>Parámetro*</b>	
A <sub>1</sub> (µg/ml)	4,458
A <sub>2</sub> (µg/ml)	0,124
A <sub>3</sub> (µg/ml)	4,582
α (h <sup>-1</sup> )	0,368
β (h <sup>-1</sup> )	0,037
K <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,503
t <sub>1/2 a</sub> (h)	1,379
t <sub>1/2 α</sub> (h)	1,883
t <sub>1/2 β</sub> (h)	18,788
K <sub>12</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,133
K <sub>21</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,066
K <sub>10</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,206
AUC (mg l <sup>-1</sup> h)	6,358
C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,586
T <sub>max</sub> (h)	2,472

\* parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

**Tabla 24.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras el quinto día (5<sup>a</sup> dosis) de la administración oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>	
<b>Quinto día de administración (54 doradas)</b>	
<b>Parámetro*</b>	
$A_1$ (µg/ml)	7,553
$A_2$ (µg/ml)	0,103
$A_3$ (µg/ml)	7,656
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	0,359
$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	0,029
$K_a$ (h <sup>-1</sup> )	0,438
$t_{1/2 a}$ (h)	1,583
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	1,933
$t_{1/2 \beta}$ (h)	23,491
$K_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	0,130
$K_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	0,051
$K_{10}$ (h <sup>-1</sup> )	0,207
AUC (mgL <sup>-1</sup> h)	7,068
$C_{max}$ (µg/ml)	0,616
$T_{max}$ (h)	2,656

\*parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

**Tabla 25.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras la administración oral de dosis de 12 mg flumequina kg p.v./día, durante cinco días consecutivos, en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>	
<b>periodo completo de dosificación (5 días) (180 doradas)</b>	
<b>Parámetro*</b>	
A <sub>1</sub> (µg/ml)	7,714
A <sub>2</sub> (µg/ml)	0,100
A <sub>3</sub> (µg/ml)	7,814
α (h <sup>-1</sup> )	0,369
β (h <sup>-1</sup> )	0,038
K <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,450
t <sub>1/2 a</sub> (h)	1,542
t <sub>1/2 α</sub> (h)	1,880
t <sub>1/2 β</sub> (h)	18,396
K <sub>12</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,109
K <sub>21</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,058
K <sub>10</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,239
AUC (mg l <sup>-1</sup> h)	6,194
C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,621
T <sub>max</sub> (h)	2,573

\*parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

**Tabla 26.** Parámetros farmacocinéticos de flumequina tras el primer día de tratamiento (D1), tras el quinto día de tratamiento (D5) y tras el periodo completo (5días) de la administración múltiple oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, en doradas

<b>GRUPO 1 TRATADO</b>			
<b>Parámetro*</b>	<b>Primera administración (D1) (54 doradas)</b>	<b>Quinta administración (D5) (54 doradas)</b>	<b>Periodo completo de dosificación (5 días consecutivos) (180 doradas)</b>
A <sub>1</sub> (µg/ml)	4,458	7,553	7,714
A <sub>2</sub> (µg/ml)	0,124	0,103	0,100
A <sub>3</sub> (µg/ml)	4,582	7,656	7,814
α (h <sup>-1</sup> )	0,368	0,359	0,369
β (h <sup>-1</sup> )	0,037	0,029	0,038
K <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,503	0,438	0,450
t <sub>1/2 a</sub> (h)	1,379	1,583	1,542
t <sub>1/2 α</sub> (h)	1,883	1,933	1,880
t <sub>1/2 β</sub> (h)	18,788	23,491	18,396
K <sub>12</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,133	0,130	0,109
K <sub>21</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,066	0,051	0,058
K <sub>10</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,206	0,207	0,239
AUC (mg l <sup>-1</sup> h)	6,358	7,068	6,194
C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,586	0,616	0,621
T <sub>max</sub> (h)	2,472	2,656	2,573

D1: día 1; D5: día 5

\* parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

### 3.2.3. Índices PK/PD correlacionados con la eficacia del antibiótico

Los datos farmacocinéticos (PK) son una herramienta útil usada para describir y predecir los perfiles de concentración de un fármaco en los fluidos biológicos (usualmente plasma) y combinarlos con datos farmacodinámicos (PD), en nuestro caso con datos de susceptibilidad bacteriana al antibiótico flumequina, ello constituye la modelización PK/PD en relación con la eficacia del antibiótico, además de minimizar el desarrollo de resistencias.

Las fluoroquinolonas en general se consideran antimicrobianos bactericidas concentración dependiente frente a bacterias Gram-negativas y algunas bacterias Gram-positivas (DUDLEY, 1991), aunque algunos investigadores afirman que en caso específico de bacterias Gram-positivas el comportamiento bactericida de las fluoroquinolonas es tiempo-dependiente (KECK Y BORNE, 1995). Al referirse a la potencial eficacia clínica de la flumequina es muy importante relacionar los datos de sensibilidad *in vitro* con la información farmacocinética correspondiente. En efecto, los estudios farmacocinéticos (PK) y los estudios de actividad *in vitro* (PD) de las fluoroquinolonas permiten predecir la dosis necesaria para lograr el resultado clínico deseado, aunque se debe confirmar con estudios clínicos. Las quinolonas son antibióticos concentración-dependiente (ZHANEL, 2001), en estos casos, los parámetros que mejor se relacionan con la eficacia de un antibiótico son las relaciones área bajo la curva (AUC)/CMI (un valor de AUC/CMI de 100-125, es necesario para asegurar la efectividad del antibiótico) (FORREST *et al.*, 1993; MADARAS-KELLY *et al.*, 1996; LODE *et al.*, 1998) y la concentración plasmática máxima ( $C_{\max}$ )/CMI (un valor de  $C_{\max}/CMI_{90} \geq 10$ ) (DUDLEY, 1991; DRUSANO *et al.*, 1993; MADARAS-KELLY *et al.*, 1996; WALKER, 2000). No obstante existen datos que indican que

valores de AUC/CMI por encima de 125 siempre no son necesarios (DALLA COSTA y DERENDORF, 1996; LACY *et al.*, 1999; LISTER y SANDERS, 1999a,b).

La **Tabla 27** recoge los parámetros farmacocinéticos seleccionados para predecir la eficacia de la flumequina en el régimen de dosificación propuesto (12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos) frente a infecciones en peces por bacterias comunes entre las que podemos destacar las siguientes junto con las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> tomadas de la literatura:

- *Vibrio anguillarum*, CMI<sub>50</sub>:  
<0,1 µg/ml (MARTISEN *et al.*, 1992; BARNES *et al.*, 1990)  
0,15 µg/ml (RIGOS *et al.*, 2003)  
<0,075-0,3 µg/ml (LEDO *et al.*, 1987)
- *V. alginolyticus*, CMI<sub>50</sub>: 1,2 µg/ml (RIGOS *et al.*, 2003)
- *V. damsela*, CMI<sub>50</sub>: 0,019 µg/ml (RIGOS *et al.*, 2003)
- *V. fluvialis*, CMI<sub>50</sub>: 0,15 µg/ml (RIGOS *et al.*, 2003)
- *Aeromonas salmonicida*, CMI<sub>50</sub>:  
0,02-0,01 µg/ml (15°C) (HOIE *et al.*, 1994)  
0,063 µg/ml (15°C) (MARTISEN *et al.*, 1992; BARNES *et al.*, 1990)  
0,18 µg/ml (4°C) (MARTISEN *et al.*, 1992; BARNES *et al.*, 1990)  
0,075 µg/ml (BARNES *et al.*, 1991)  
<0,075 µg/ml; CMI<sub>90</sub>: 0,1 µg/ml (BARNES *et al.*, 1991)
- *Yersinia ruckeri*: CMI<sub>50</sub>: 0,075-0,3 µg/ml (LEDO *et al.*, 1987)

**Tabla 27.** Predictores de eficacia (AUC/CMI<sub>50</sub>, AUC/CMI<sub>90</sub>, C<sub>max</sub>/CMI<sub>50</sub> y C<sub>max</sub>/CMI<sub>90</sub>) estimados para flumequina tras dosis múltiple oral 12 mg/kg p.v./día frente a bacterias comunes en doradas.

<b>Parámetros farmacocinéticos (valor medio)</b>			
C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,621		
AUC (µg/ml/h)	6,194		
<b>Índices PK/PD</b>			
AUC/ CMI <sub>50</sub>	<sup>a</sup> 82 - 21	<sup>b</sup> 326	<sup>c</sup> 41
	<sup>d</sup> 619 - 98	<sup>e</sup> 62	<sup>f</sup> 82 - 21
C <sub>max</sub> / CMI <sub>50</sub>	<sup>a</sup> 8,3 - 2,1	<sup>b</sup> 32,7	<sup>c</sup> 4,1
	<sup>d</sup> 62 - 9,8	<sup>e</sup> 6,2	<sup>f</sup> 8,3 - 2,1

<sup>a</sup>*Vibrio anguillarum*, CMI<sub>50</sub>: 0,075- 0,3 µg/ml

<sup>b</sup>*Vibrio damsela*, CMI<sub>50</sub>: 0,019 µg/ml

<sup>c</sup>*Vibrio fluvialis*, CMI<sub>50</sub>: 0,15 µg/ml

<sup>d</sup>*Aeromonas salmonicida*, CMI<sub>50</sub>: 0,01-0,063 µg/ml (15°C)

<sup>e</sup>*Aeromonas salmonicida*, CMI<sub>90</sub>: 0,1µg/ml

<sup>f</sup>*Yersinia ruckeri*, CMI<sub>50</sub>: 0,075-0,3 µg/ml

### 3.3. Distribución y depleción tisular de flumequina tras administración múltiple oral de flumequina en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758)

Tras la administración oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día durante 5 días consecutivos, se detectó la presencia del compuesto flumequina en músculo + piel en proporciones naturales, en doradas; los valores obtenidos se presentan en la **Tabla 28**.

Para considerar la influencia de la temperatura del agua en las funciones fisiológicas y/o metabolismo de los peces y consecuentemente en la depleción de fármacos, el tiempo se expresa como grado-día. Los grados-día obtenidos en nuestro estudio fueron calculados multiplicando la media diaria de las temperaturas del agua (18 °C) por el número total de días medidos (14 días de duración del experimento) resultando 252 °C-día (EMEA, 2008) (**Tabla 29**).

Las concentraciones medias de flumequina en músculo + piel en proporciones naturales se representan también mediante gráficos de líneas en la **Figura 11**.

Estos resultados demuestran que la flumequina posee una buena distribución tisular. A las 3 horas tras la última administración de 12 mg flumequina/kg p.v./día, los niveles medios de flumequina encontrados en tejido fueron de  $1564,98 \pm 242,64$  µg/kg.

A las 24 horas tras la administración oral de la última dosis de flumequina, los valores medios tisulares de flumequina detectados declinaron considerablemente, encontrándose concentraciones en tejido músculo + piel de  $131,14 \pm 46,67$  µg/kg. Transcurridos 2, 3, 8, 10 y 14 días después de finalizado el tratamiento, las concentraciones de flumequina en tejido disminuyeron detectándose concentraciones que fueron a los 2 días  $13,53 \pm 4,38$  µg/kg y a los 3 días  $7,54 \pm 2,41$  µg/kg. En las

muestras de tejido analizadas correspondientes a los 8, 10 y 14 días no se encontraron residuos de flumequina superiores al límite de cuantificación de la técnica analítica.

**Tabla 28.** Niveles tisulares medios ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de flumequina tras administración oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día durante 5 días, en doradas

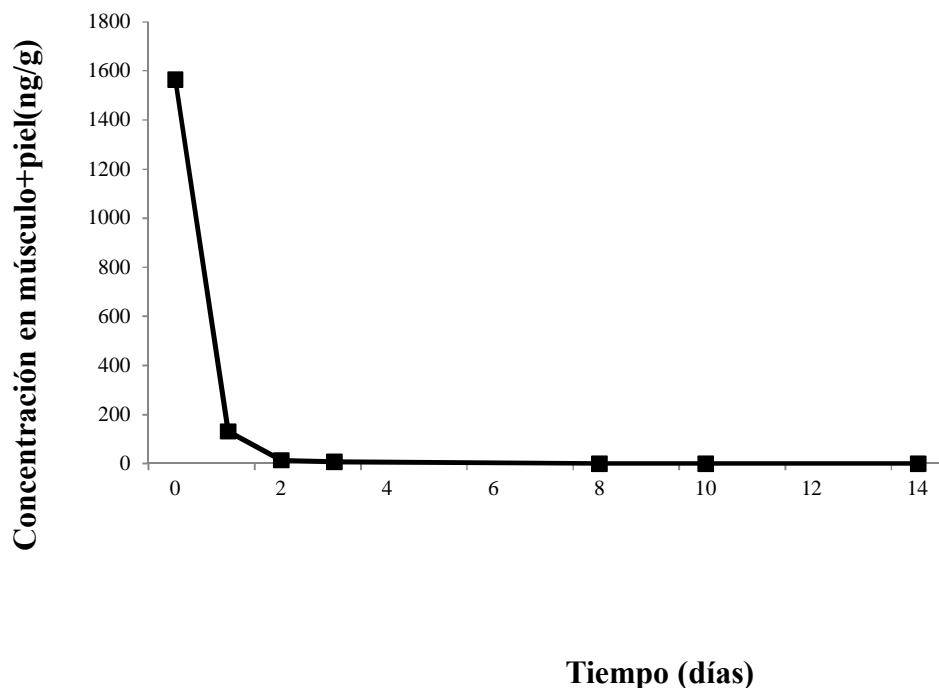
Tiempo tras la última dosis	GRUPO 2 TRATADO (49 doradas)		
	Animales (49 doradas) (n° identificación)	Músculo + piel	Valor medio (n=7) $\pm$ DS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
3 horas (0,125 días)	P1	1240,70	1564,98 $\pm$ 242,64
	P2	1311,70	
	P3	1526,25	
	P4	1624,35	
	P5	1960,15	
	P6	1576,35	
	P7	1715,35	
24 horas (1 día)	P8	72,65	131,14 $\pm$ 46,67
	P9	169,40	
	P10	170,20	
	P11	104,70	
	P12	71,00	
	P13	160,00	
	P14	170,00	
48 horas (2 días)	P15	11,55	13,53 $\pm$ 4,38
	P16	18,05	
	P17	7,90	
	P18	12,65	
	P19	11,00	
	P20	12,85	
	P21	20,70	
72 horas (3 días)	P22	5,60	7,54 $\pm$ 2,41
	P23	10,80	
	P24	7,95	
	P25	6,15	
	P26	6,60	
	P27	4,90	
	P28	10,80	
192 horas (8 días)	P29	<LOD	
	P30	<LOD	
	P31	<LOD	
	P32	<LOD	
	P33	<LOD	
	P34	<LOD	
	P35	<LOD	

(Continuación Tabla 28)

Tiempo tras la última dosis	GRUPO 2 TRATADO (49 doradas)		
	Animal (n° identificación)	Músculo + piel	Valor medio (n=7) ± DS ( µg/kg )
		µg/kg	
240 horas (10 días)	P36	<LOD	
	P37	<LOD	
	P38	<LOD	
	P39	<LOD	
	P40	<LOD	
	P41	<LOD	
	P42	<LOD	
336 horas (14 días)	P43	<LOD	
	P44	<LOD	
	P45	<LOD	
	P46	<LOD	
	P47	<LOD	
	P48	<LOD	
	P49	<LOD	

**Tabla 29.** Depleción de residuos de flumequina tras administración oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día durante 5 días consecutivos en doradas

Tiempo después de la última dosis (12 mg /kg p.v./día)		Músculo + piel
Días	Grados-Día	Flumequina Valor medio (µg/kg) ± DS (n = 7)
0,125	2,25	1564,98 ± 242,64
1	18	131,14 ± 46,67
2	36	13,529 ± 4,38
3	54	7,54 ± 2,41
8	144	<LOD
10	180	<LOD
14	252	<LOD



**Figura 11.** Depleción de residuos de flumequina en músculo + piel de doradas tras administración oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día durante 5 días consecutivos

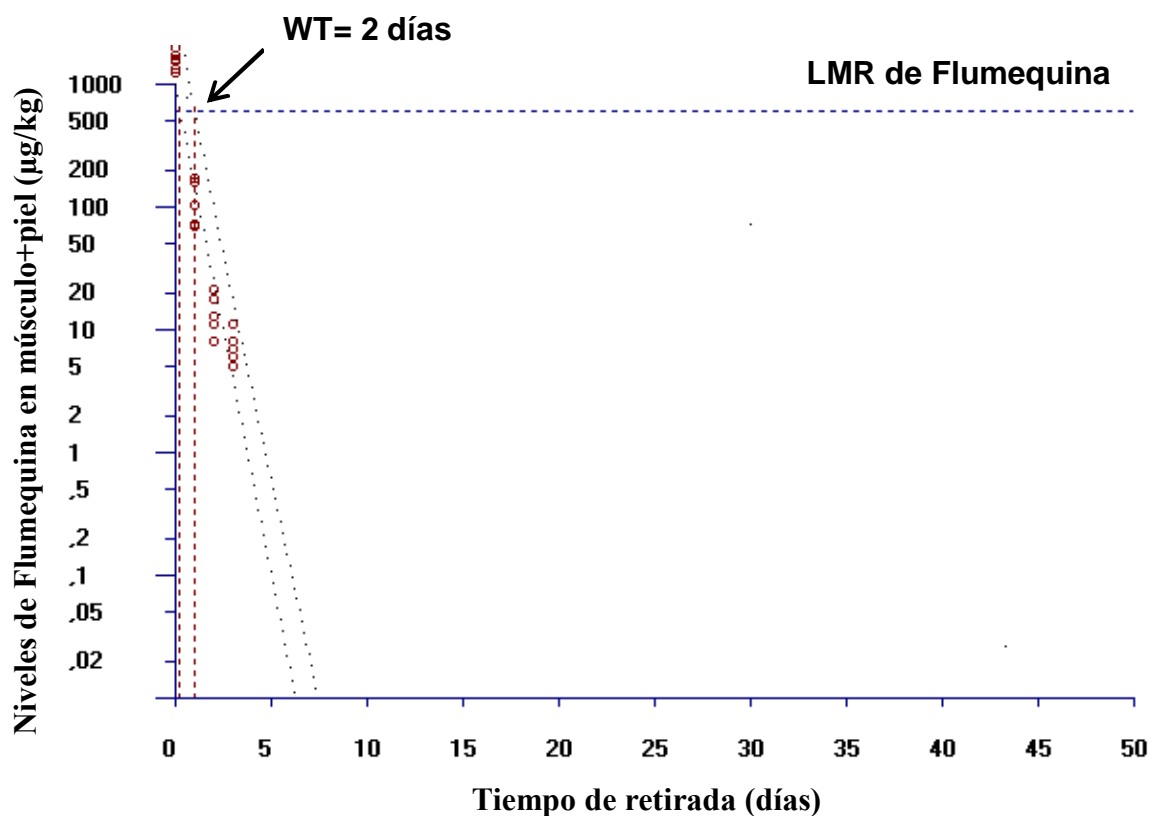
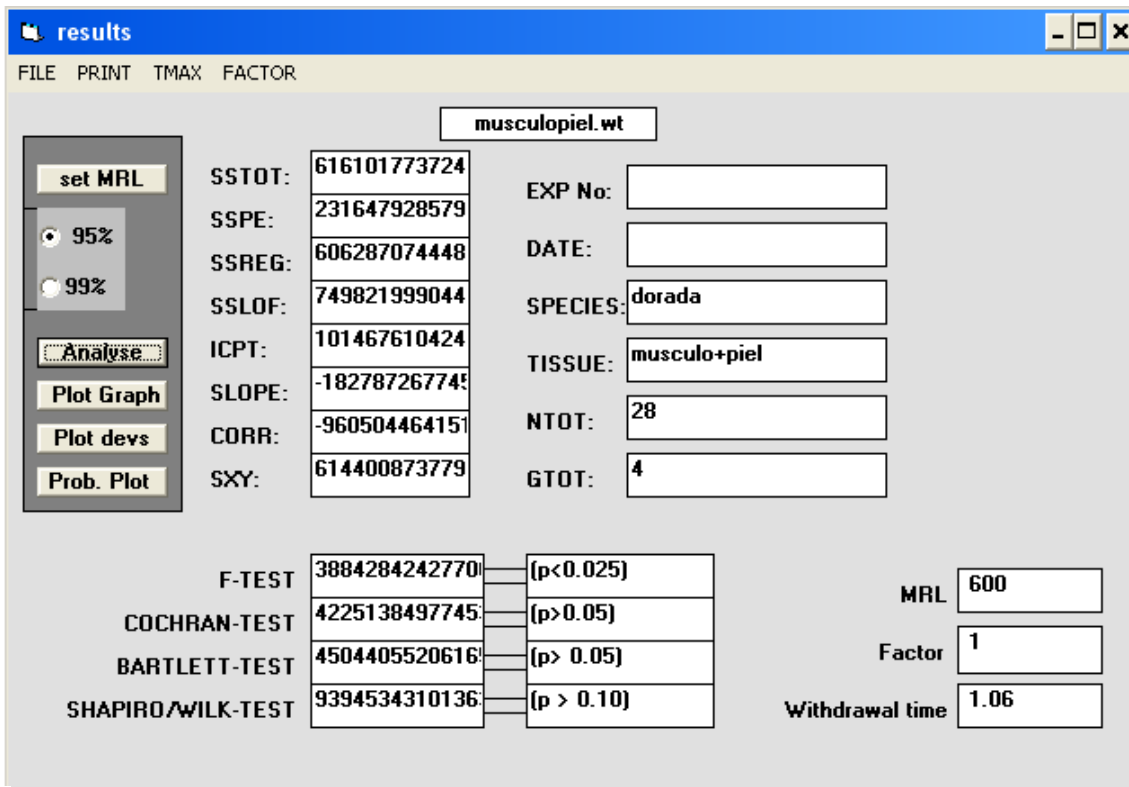
Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, cuando un fármaco es administrado para propósitos terapéuticos en un animal productor de alimentos, como es el caso del pez dorada, como medida de seguridad para el consumidor se exige establecer el tiempo de espera o periodo necesario para asegurar que los residuos en los tejidos estén por debajo de los LMR establecidos.

Existen numerosos diseños experimentales y estadísticos para establecer el tiempo de espera. La EMEA recomienda para la armonización de los tiempos de retirada el uso de un programa de regresión lineal como método estadístico de elección (EMEA, 2002). Usando este programa, el tiempo de espera o retirada se determina como el tiempo cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%. Como ya mencionamos en el capítulo correspondiente a residuos, la Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la

flumequina en peces de 600 ng/g para músculo + piel en proporciones naturales. (REGLAMENTO (UE) nº 37/2010).

En el presente estudio en doradas, para determinar la depleción de flumequina, tras la administración oral de una dosis de 12 mg flumequina /kg p.v./día durante 5 días, hemos evaluado los resultados de los niveles tisulares totales obtenidos de flumequina (**Tabla 28**). Aplicando el programa estadístico recomendado por la EMEA de regresión lineal para músculo + piel en proporciones naturales obtenidos en nuestro ensayo (dosis de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos) en base de los niveles detectados de flumequina (**Tabla 28**) y analizando los resultados obtenemos un tiempo de espera de 1,06 días (**Figura 12**) para asegurar el cumplimiento del LMR.

En conclusión, en el presente estudio tras dosis oral múltiple de 12 mg flumequina /kg p.v./día durante 5 días en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) se recomienda un tiempo de retirada del medicamento de 2 días previo al sacrificio que a una temperatura del agua de 18°C equivale a 19,08 grados-día, para consumo humano como medida de salud pública.



**Figura 12.** Residuos de flumequina en músculo + piel en proporciones naturales de doradas tras la administración oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día, durante 5 días. Datos generados usando el software de EMEA (EMEA, 2002). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para músculo+piel

#### 4. DISCUSIÓN

Las fluoroquinolonas suponen una importante opción para el tratamiento empírico frente a infecciones graves causadas por bacterias Gram-negativas. Son utilizadas en situaciones en las cuales las pruebas microbiológicas y de susceptibilidad pudieran ser eficaces para el tratamiento de infecciones severas o recurrentes del tracto urinario, piel o tejidos blandos. El uso inadecuado de estos antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencias bacterianas lo cual podría provocar la retirada de estos antibióticos del arsenal de fármacos veterinarios. Por lo tanto, se deberían considerar las características farmacocinéticas de estos antibióticos combinadas con su susceptibilidad microbiológica en la elección de tratamientos para maximizar la eficacia y minimizar el desarrollo de resistencias bacterianas (ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1992).

La alta densidad de peces que tienen las piscifactorías facilita la transferencia de enfermedades bacterianas, por lo que si no se tratan a tiempo puede originarse una gran pérdida económica por la mortalidad y/o un crecimiento reducido de los peces enfermos implicados. También, el uso inadecuado de los antibióticos en las piscifactorías puede causar riesgos potenciales por residuos de estos fármacos en los peces destinados a consumo humano e inducir resistencias a antibióticos en las bacterias; además, el uso de fármacos en las piscifactorías también puede originar impacto en el medio acuático. Como desventaja a la óptima elección del régimen de dosificación, tenemos que resaltar que la dosis de los compuestos antimicrobianos en la práctica piscícola, a menudo, se extrapola de investigaciones llevadas a cabo en mamíferos, por existir limitados datos farmacocinéticos en especies acuáticas que soporten esta elección de dosis.

Las piscifactorías están incrementando cada vez más, siendo en el área mediterránea una industria con cada vez más intereses en la producción de especies con destino a consumo humano. En la última década, los peces en sistemas intensivos han sido propensos a infecciones parasíticas y bacterianas. Infecciones por *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas salmonicida* y *Edwardsiella tarda* han producido graves pérdidas con alta mortalidad, con el agravante de que no existen vacunas útiles frente a estas infecciones. Solamente se pueden tratar estas infecciones con antimicrobianos. La vía común de administración de agentes antibacterianos es por baño y principalmente por incorporación a la dieta ya que permite el tratamiento de toda la población sin someterles a ningún estrés y con mínimos costes, aunque tiene como desventaja la pérdida de apetito que sufren los peces con enfermedades bacterianas en las piscifactorías.

Los primeros avances en la quimioterapia en piscifactorías fueron revisados por AUSTIN y AUSTIN (1987) y ALDERMAN (1988). La flumequina, antibiótico objeto de nuestro estudio, compuesto bactericida con amplia actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram-negativos y algunos Gram-positivos, ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de enfermedades sistémicas bacterianas en acuicultura. Su uso en acuicultura en Europa está bien documentado, particularmente en la industria del salmón Atlántico (GRAVE et al., 1996). Se administra en el pienso, preferentemente en forma de “pellets” o alternativamente en forma de premezclas (GRAVE et al., 1990; HORSBERG y BERGE, 1986). Es eficaz frente a infecciones bacterianas comunes tales como furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), furunculosis atípicas (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*), vibriosis clásica (*Listonella (Vibrio) anguillarum*), vibriosis de agua fría (*Vibrio salmonicida*) y yersiniosis (*Yersinia ruckeri*) (AUSTIN et al., 1983;

CHEVALIER et al., 1981; O'GRADY et al., 1988; HUSTVEDT et al., 1992; RODGERS y AUSTIN, 1983; SAMUELSEN y BERGH, 2004).

En diversas especies de peces de agua dulce y salada se han llevado a cabo estudios farmacocinéticos de la flumequina tras diversas vías de administración del fármaco, tales como en fletan (*Hippoglossus hippoglossus*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (SAMUELSEN & ERVIK, 1997; HANSEN y HORSBERG, 1999), en porredana (SAMUELSEN y ERVIK, 2001), en lubina (RIGOS et al., 2002), en anguila (*Anguilla anguilla*) y carpa (BOON et al., 1991; HANSEN y HORSBERG, 2000a; VAN DER HEIJDEN et al., 1994), en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) ( PLAKAS et al., 2000), en trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) (SOHLBERG et al., 1990; CHEVALIER et al., 1981), en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (SOHLBERG et al., 1994), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (ROGSTAD et al., 1993; ELEMA et al., 1994, 1995; MARTINSEN y HORSBERG, 1955; ELLINNGSEN et al., 2002; SOHLBERG et al., 2002).

Sin embargo, a nuestro conocimiento, en el pez dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) existe en la literatura una información muy limitada del perfil cinético de la flumequina, únicamente el trabajo de RIGOS et al. (2003) sobre la cinética de la flumequina tras administración intravenosa y los trabajos de MALVISI et al. (1997) y TYPERNOU et al. (2003) sobre su distribución y depleción tisular tras administración oral. El presente estudio fue diseñado para proporcionar información adicional sobre las propiedades farmacocinéticas de la flumequina tras administración oral así como también verificar a través del calculo de parámetros PK-PD si el régimen de dosis aplicada es eficaz frente a agentes patógenos causantes de enfermedades bacterianas en el pez dorada (*Sparus aurata*).

La disposición de la flumequina tras la administración oral vía pienso (12 mg/kg p.v.) en doradas mantenidas a una temperatura del agua de 18°C fue descrita adecuadamente mediante un modelo abierto bicompartimental, con una primera fase de distribución  $\alpha$ , seguido de una segunda fase de eliminación  $\beta$  más lenta, dato similar a los encontrados en la misma especie por RIGOS *et al.* (2003) tras dosis oral de 20 mg/kg p.v., a una temperatura del agua de 19°C. En otros trabajos previos realizados en especies de peces de agua dulce que incluyen la carpa (*Cyprinus carpio*), pez gato (*Clarias gariepinus*), anguila (*Anguilla anguilla*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1994; SOHLBERG *et al.*, 1994) y en especies de agua salada que incluyen salmón Atlántico (*Salmo salar*) y fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (ROGSTAD *et al.*, 1993; ELEMA *et al.*, 1995; MARTINSEN y HORSBERG, 1995; SAMUELSEN y ERVIK, 1997) también se ha descrito que un modelo bicompartimental o tricompartmental es el mejor ajuste de los datos experimentales para el cálculo de los parámetros cinéticos. Sin embargo, otros estudios cinéticos en especies de peces mantenidos en agua dulce y/o en agua salada definen otros modelos para el cálculo de los parámetros cinéticos (ELEMA *et al.*, 1994; PLAKAS *et al.*, 2000; HANSEN y HORSBERG, 1999, 2000a). Dado que los estudios descritos en la literatura se refieren a diferentes especies de peces, tamaño, temperatura del agua y diferentes dosis y vías de administración del fármaco, es difícil deducir cuál es el factor principal que afecta al modelo cinético aplicable.

El presente trabajo demuestra que la flumequina en doradas se absorbe rápidamente tras la administración única oral de 12 mg flumequina/kg p.v. (temperatura del agua 18 ° C) siendo la semivida de absorción de 1,379 h, valor mas rápido que el descrito por PLAKAS *et al.* (2000) en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) de 4,9 h. En nuestro estudio, en doradas se obtuvo una concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de

0,586  $\mu\text{g/ml}$  a un tiempo ( $T_{\text{max}}$ ) de 2,472 h, resultado en cierto modo comparable al obtenido previamente también en doradas por RIGOS *et al.* (2003) quienes describen, a una temperatura del agua de 19 ° C, una  $C_{\text{max}}$  de 1,73  $\mu\text{g/ml}$  tras dosis oral intragástrica de 20 mg/kg p.v. pero a un tiempo mucho más prolongado ( $T_{\text{max}}$ ) de 16 h pos-administración.

ROGSTAD *et al.* (1993) obtienen, en salmón tras administración de flumequina también en pienso medicado pero a una dosis superior de 25 mg/kg p.v. y a una temperatura del agua de 5 ° C, valores de  $C_{\text{max}}$  de 2,26  $\mu\text{g/ml}$  en un  $T_{\text{max}}$  de 12 h. La absorción propiamente es dosis-dependiente, así como también parece ser temperatura del agua-dependiente. Dado que los peces son organismos poiquiloterms, los procesos de absorción, metabolismo y excreción pueden estar significativamente afectados por la temperatura del agua. Existe evidencia que sugiere que a menor temperatura del agua se retarda la absorción del fármaco.

Nuestros resultados obtenidos en los parámetros  $C_{\text{max}}$  y  $T_{\text{max}}$  también lógicamente difieren con aquellos descritos tras la administración oral intragástrica (es decir por gavage) en diversas especies de peces que a continuación se describen: en trucha arco iris, dosis de 5 mg flumequina/kg p.v. a una temperatura del agua de 13 ° C ( $C_{\text{max}}$  1,91  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_{\text{max}}$  19 h) (SOHLBERG *et al.*, 1994); en salmón, dosis de flumequina de 25 mg/kg p.v. a una temperatura del agua de 6-8 ° C, ( $C_{\text{max}}$  rango 1,55-2,61  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_{\text{max}}$  rango 9,95-27,1 h) (ELEMA *et al.*, 1995) y a una temperatura del agua de 10 ° C ( $C_{\text{max}}$  1,42  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_{\text{max}}$  6 h) (MARTINSEN y HORSBERG, 1995); en fletán, dosis de flumequina de 25 mg/kg p.v. a una temperatura del agua de 9 ° C ( $C_{\text{max}}$  2,7  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_{\text{max}}$  20 h) (SAMUELSEN y ERVIK, 1997); y en la anguila, dosis de 10 mg flumequina/kg p.v. a 23 ° C de temperatura del agua ( $C_{\text{max}}$  9,3  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_{\text{max}}$  7 h)

(HANSEN y HORSBERG, 2000a). En nuestro estudio, la administración del antibiótico en el pienso medicado puede ser un factor por el que se obtiene un menor valor de la concentración máxima plasmática en comparación con el obtenido en estos estudios anteriormente mencionados donde la administración del antibiótico fue por gavage. El conocimiento de los parámetros cinéticos de absorción tras la administración de flumequina en el pienso medicado es del todo importante a efectos de que es la vía común usada en acuicultura para el tratamiento profiláctico y quimioterápico para el control de infecciones bacterianas, a pesar de que frecuentemente los peces enfermos tienden a ser anoréxicos y esto es por lo que en ocasiones puntuales se ensayan otros métodos alternativos tales como la administración de antibióticos por gavage y la administración usando tratamientos de baño (GRADY *et al.*, 1988).

En nuestro estudio, la flumequina se distribuye rápidamente a los tejidos de la dorada a partir del compartimiento sanguíneo con un valor  $t_{1/2\alpha}$  de 1,883 h a una temperatura del agua de 18 ° C, valor mayor que el observado previamente en la misma especie por RIGOS *et al.*, 2003 ( $t_{1/2\alpha} = 0,2$  h) a una temperatura del agua de 20 ° C tras dosis IV de 10 mg/kg p.v, así como también mayor al observado en el fletán por SAMUELSEN y ERVICK (1997) ( $t_{1/2\alpha} = 0,8$  h) a una temperatura del agua de 9 ° C tras dosis IV de 12 mg/kg p.v, y en salmón por ROGSTAD *et al.*, (1993) y por ELEMA *et al.* (1995) ( $t_{1/2\alpha} = 1,3$  h) a una temperatura del agua de 5 ° C tras dosis IV de 5 mg/kg p.v., y a una temperatura del agua de 6-8 °C tras dosis IV de 10 mg/kg p.v., respectivamente. El valor de  $t_{1/2\alpha}$  encontrado en nuestro estudio es menor al observado en salmon ( $t_{1/2\alpha}$  de 3,1 h) a una temperatura del agua de 10 ° C tras dosis IV de 25 mg/kg p.v. (MARTINSEN y HORSBERG, 1995), en cat-fish ( $t_{1/2\alpha}$  de 7,3 h) a una temperatura del agua de 24 ° C tras dosis de 18 mg/kg p.v. vía intragástrica (VAN DER HEIJDEN *et*

*al.*, 1994) y en la trucha arco iris ( $t_{1/2\alpha}$  de 16 h) a una temperatura del agua de 13 ° C tras dosis de 5 mg/kg p.v. vía intragástrica (SOHLBERG *et al.*, 1994),.

El efecto de la temperatura del agua se hace patente no solo en las magnitudes relativas de la semivida de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) sino también en la semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ). En doradas no ha sido descrito la disposición cinética de la flumequina tras administración oral; solamente en la literatura tenemos el trabajo de RIGOS *et al.* (2003) quienes describen una semivida de eliminación de 30 h tras dosis IV de 10 mg/kg p.v. a una temperatura del agua de 19 °C. En nuestro estudio, la semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de la flumequina en la dorada a temperatura del agua de 18 ° C ( $t_{1/2\beta}$  de 18,788 h) tras la administración única oral vía pienso medicado a dosis de 12 mg/kg p.v., y tras la administración múltiple oral, 5 días ( $t_{1/2\beta}$  de 18,396 h) fue menor a la observada en fletán y en rodaballo de 43 y 42 h, a temperatura del agua 10 °C, respectivamente, tras dosis oral intragástrica de 10 mg/kg p.v. (HANSEN y HORSBERG, 1999), en salmón de 30-40 h, a temperatura del agua de 6-8 °C tras dosis oral intragástrica de 25 mg/kg p.v. (ELEMA *et al.*, 1995), y en bagre de canal de 21,8 h a una temperatura del agua de 24°C tras dosis oral intragástrica de 5 mg/kg p.v. (PLAKAS *et al.*, 2000). Los índices metabólicos y/o excretores de los peces se ven incrementados por la temperatura (ELLIS *et al.*, 1978) probablemente debido a una mayor índice de la producción de bilis (CURTIS *et al.*, 1986) y a la composición lipídica de la membrana (HAZEL, 1984). También se ha observado una menor producción de orina a temperaturas bajas lo que puede originar una más lenta eliminación de los fármacos (HUNN, 1982; HAUG y HALS, 2000).

En el presente estudio, también se describe el perfil farmacocinético de la flumequina tras la administración múltiple oral vía pienso medicado (12 mg

flumequina/kg p.v./día, 5 días). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de las curvas de niveles medios plasmáticos vs tiempo de flumequina que describen los procesos de absorción, distribución y eliminación en plasma tras la administración única oral y tras la administración múltiple oral fueron similares. En comparación, la concentración máxima plasmática ( $C_{max}$ ) de flumequina fue 0,586  $\mu\text{g/ml}$  tras dosis única oral de 12 mg/kg p.v. y 0,621  $\mu\text{g/ml}$  tras la administración múltiple oral de 12 mg/kg p.v./día, 5 días. El área bajo la curva (AUC) de flumequina fue 6,358  $\text{mg l}^{-1}\text{h}$  tras dosis única de 12 mg/kg p.v. y de 6,194  $\text{mg l}^{-1}\text{h}$  tras la administración múltiple oral de 12 mg/kg p.c./día, 5 días. La semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) fue de 18,788 h tras dosis única de 12 mg/kg y de 18,396 h tras la administración múltiple oral de 12 mg/kg p.v./día, 5 días. Estos resultados indican que no existe una acumulación de flumequina en doradas tras la dosis oral repetida así como tampoco una saturación en su excreción. Además, los parámetros farmacocinéticos de  $C_{max}$  y AUC calculados en el día 5 de la administración con valores de 0,616  $\mu\text{g/ml}$  y 7,068  $\text{mg l}^{-1}\text{h}$  respectivamente, vuelven a confirmar la no acumulación del fármaco en los peces tratados con dosis múltiple oral de 12 mg/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos.

La inter-relación farmacocinética (PK) / farmacodinámica (PD) es una herramienta versátil que principalmente se utiliza para seleccionar regímenes de dosis eficaces (dosis e intervalo), aunque se deben confirmar posteriormente en un ensayo clínico. En la integración PK/PD, la concentración plasmática del fármaco juega un papel importante para predecir una eficacia. Existe evidencia para confirmar que los parámetros cinéticos claves son la  $C_{max}$  y el AUC y el parámetro farmacodinámico clave en el caso de un antibiótico es la CMI. La integración PK/PD habitualmente se estudia en paralelo durante el desarrollo del medicamento, sin embargo para el caso de medicamentos en peces existe información muy limitada de estos estudios. El objetivo

final de la integración PK/PD es el uso racional del antibiótico bajo dos premisas: (1) optimizar la eficacia clínica y (2) minimizar la selección y la transferencia de patógenos resistentes (LEES y ALIABADI, 2002; TOUTAIN *et al.*, 2002). En general, para predecir una eficacia antibiótica se utilizan los índices AUC/CMI,  $C_{\max}$ /CMI y el índice T>CMI (el tiempo durante el cuál la concentración plasmática excede a la CMI, expresado como un porcentaje de intervalo de dosis) índice este último seleccionado para los antibióticos tiempo-dependientes, tales como  $\beta$ -lactámicos y macrólidos. Los índices AUC/CMI,  $C_{\max}$ /CMI y T>CMI son índices PK/PD de eficacia porque son implícitos de la farmacocinética y de la farmacodinamia, es decir son parámetros que implican la disposición cinética del fármaco y la susceptibilidad microbiológica (HYATT *et al.*, 1995; SCHENTAG *et al.*, 1985). Se debe resaltar que estos índices PK/PD predictivos de eficacia *in vivo* se calculan a partir de las concentraciones del antibiótico libre en plasma, no del nivel total tisular del antibiótico. Además, la mayoría de los patógenos de interés clínico se localizan extracelularmente y la biofase para el antibiótico es el fluido extracelular (SCHENTAG, 1989). Sin embargo, si los patógenos son intracelulares o si existe una barrera para la difusión del antibiótico, la concentración plasmática puede ser menos útil para predecir las concentraciones en el lugar de infección. En general, los tres índices anteriormente mencionados se utilizan para una eficacia clínica con erradicación bacteriana, aunque es necesario chequear su validez clínica.

Los índices  $C_{\max}$ /CMI y AUC/CMI se consideran puntos críticos para la eficacia de las fluoroquinolonas (BROWN, 1996; SHOJAEE y LEES, 1997; CRAIG y DALHOFF, 1998) y vienen siendo utilizados para diseñar regímenes eficaces de dosis. Se ha propuesto que el punto crítico para determinar la eficacia de fluoroquinolonas es una razón  $C_{\max}$ /CMI  $\geq 10$ , o bien una razón AUC/CMI  $\geq 125$  (DRUSANO *et al.*, 1993;

MEINEN *et al.*, 1995; SCHENTAG, 1991; FORREST *et al.*, 1993). No obstante DALLA COSTA y DERENDORF (1996) han presentado un análisis de eficacia indicando que valores de AUC/CMI  $\geq 125$  no siempre son necesarios. También en este sentido, MADARAS-KELLY *et al.* (1996) señalan que valores de AUC/CMI de 50-75 pueden ser eficaces. El antibiótico fluoroquinolona objeto de nuestro estudio, la flumequina, presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a la mayoría de patógenos que afectan a los peces. En acuicultura, enfermedades clásicas como furunculosis (por *Aeromonas salmonicida*) y vibriosis (por *Vibrio anguillarum* y *Vibrio damsela*) son causa todavía de problemas importantes, incluso mortalidad, que conlleva una grave pérdida económica. Tomando valores de CMI<sub>50</sub> de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  para *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio damsela* y el parámetro cinético AUC de la flumequina calculado en nuestro estudio (12 mg/kg p.v./día, 5 días) se puede anticipar una razón C<sub>max</sub>/CMI de  $\geq 62$ , y una razón AUC/CMI de  $\geq 619$ . Sin embargo, tomando valores de CMI<sub>50</sub> de 0,075  $\mu\text{g/ml}$  para *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri* y el parámetro cinético AUC de la flumequina calculado en nuestro estudio (12 mg/kg p.v./día, 5 días) se puede anticipar una razón C<sub>max</sub>/CMI de  $\geq 8,3$ , y una razón AUC/CMI de  $\geq 82$ .

Sobre la base de los resultados de este estudio se puede sugerir que la flumequina administrada vía pienso en doradas en cultivo a una temperatura de agua de 18 °C se debe utilizar para una eficacia clínica a dosis de 12 mg/kg p.v./día durante 5 días, aconsejándose no utilizar nunca dosis menores para minimizar el riesgo del desarrollo de resistencias antimicrobianas.

Nuestro estudio también presenta la depleción tisular de flumequina en doradas tras dosis de 12 mg/kg p.v./día durante 5 días. En medicina veterinaria, cuando la flumequina se administra con fines terapéuticos, es importante, desde el punto de vista

de la salud pública, conocer su persistencia en los tejidos de animales de consumo humano a efectos de calcular el tiempo de espera o periodo de retirada del medicamento previo al sacrificio del animal como parámetro de seguridad alimentaria para el consumidor. El periodo de retirada se define como el tiempo necesario para asegurar que los residuos estén por debajo de los LMR establecidos. El Comité de Productos Veterinarios (CVMP) de la EMEA ha establecido para la flumequina, en las distintas especies de peces para consumo humano en las que se ha autorizado su uso, un LMR de 600 µg/kg para músculo + piel en proporciones naturales, expresado como residuo marcador flumequina (REGLAMENTO (UE) nº 37/2010).

Limitados estudios sobre la depleción tisular de flumequina en peces han sido publicados. ELEMA *et al.* (1994) observan en el salmón que las concentraciones más altas de flumequina se encuentran en la piel, siendo las concentraciones en musculo la mitad de las encontradas en piel, confirmándose lo que previamente se había apuntado que la flumequina se retiene o se acumula en la piel de los peces (STEFFENAK *et al.*, 1991). Sin embargo, posteriormente PLAKAS *et al.* (2000) señalan en bagre de canal a las 24 h pos-administración oral (5 mg/kg p.v.) que las concentraciones más altas de residuos de flumequina se encuentran en hígado y las más bajas en musculo. En cualquier caso, en nuestra legislación para cumplir el LMR de sustancias farmacológicamente activas en especies de peces, el tejido target es musculo + piel en proporciones naturales.

Estudios de distribución y depleción tisular de flumequina en doradas solamente a nuestro conocimiento están los publicados por MALVISI *et al.* (1997) y TYRPENOU *et al.* (2003).

MALVISI *et al.* (1997) estudiaron en doradas la depleción tisular de flumequina tras dosis oral de 12 mg/kg p.v., 5 días, vía pienso medicado, a una temperatura del agua de 25-28°C, observando valores de 0,068 µg/g en musculo (sin piel) y de 0,317 µg/g en piel a las 24 h pos-tratamiento. En nuestro estudio llevado a cabo también en doradas a la misma dosificación 12 mg/kg p.v., 5 días, pero a una temperatura del agua de 18 °C, encontramos valores menores 131,14 µg/kg de flumequina en musculo + piel en proporciones naturales a las 24 h pos-tratamiento. El segundo estudio descrito (TYRPENOU *et al.*, 2003) también examina en doradas la depleción de flumequina en musculo + piel a temperaturas de 18 y 24 ° C tras dosis oral de 35 mg/kg p.v./día, 5 días, vía pienso medicado, observando valores de 369 y 227 µg/kg de flumequina a las 72 h (3 días), respectivamente. En nuestro estudio llevado a cabo también en doradas a menor dosis 12 mg/kg p.v., 5 días, a una temperatura del agua de 18 ° C, encontramos también valores mucho menores 7,54 µg/kg de flumequina en musculo + piel en proporciones naturales a las 72 h (3 días) pos-tratamiento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo en doradas muestran una más rápida depleción tisular de la flumequina que aquellos previamente descritos (MALVISI *et al.*, 1997; TYRPENOU *et al.*, 2003) que podría ser debido a un diferente comportamiento farmacocinético de la flumequina probablemente debido a diferencias en el protocolo experimental y condiciones ambientales (SAMUELSEN *et al.*, 1994). Estos resultados demuestran que la estimación del tiempo de retirada debe de ser realizado para cada medicamento, en cada una de las especies de destino, con la dosis aprobada para su uso, y bajo las condiciones ambientales definidas y usadas en la piscifactoría.

Existen numerosos diseños experimentales y métodos estadísticos para establecer el tiempo de espera. La EMEA recomienda el uso de un método estadístico de regresión lineal, como método de elección (EMEA, 2002). Usando este método, el

tiempo de espera se determina como el tiempo, cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%.

En nuestro estudio, tomando como residuo marcador la flumequina y utilizando el programa recomendado por la EMEA, obtenemos un tiempo de espera o de retirada de 1,06 días, tras el régimen de dosificación de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días consecutivos, para asegurar que los residuos de flumequina estén por debajo del LMR legislado. En consecuencia, el tiempo de retirada recomendado como medida de salud pública es de 2 días previo al sacrificio, que a una temperatura del agua de 18°C equivale a 19,08 grados-día.

En resumen, la flumequina posee propiedades óptimas para el uso terapéutico frente a infecciones comunes en doradas, la dosificación recomendada para su administración vía pienso no debe ser inferior a 12 mg flumequina/kg p.v. Para una dosis oral 12 mg flumequina/kg p.v. durante 5 días a una temperatura del agua de 18°C, un tiempo de retirada del medicamento de 2 días previo al sacrificio es necesario para asegurar que las concentraciones de residuos de flumequina en musculo + piel sean menores que el LMR establecido por la UE.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) El presente trabajo describe el comportamiento farmacocinético y la depleción tisular del compuesto antimicrobiano flumequina en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758).
- 2) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la curva de los niveles medios plasmáticos-tiempo de flumequina tras la administración de dosis única oral, vía pienso medicado, 12 mg flumequina/kg p.v., a una temperatura del agua de 18 °C, se ajusta adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose la siguiente ecuación exponencial:

$$C_p = 4,458 \times e^{-0,368t} + 0,124 \times e^{-0,037t} - 4,582 \times e^{-0,503t}$$

- 3) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la flumequina se absorbe rápidamente tras administración de dosis única oral 12 mg flumequina/kg p.v., con una semivida plasmática de absorción ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 1,379 h; alcanzándose una concentración máxima plasmática ( $C_{\max}$ ) de 0,586 µg/ml en un tiempo ( $T_{\max}$ ) de 2,472 h. Tras su absorción, la flumequina se distribuye rápidamente con una semivida plasmática de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 1,883 h seguido de una eliminación más lenta con una semivida plasmática de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de 18,788 h.
- 4) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la curva de los niveles medios plasmáticos-tiempo de flumequina tras la administración de dosis múltiple oral, vía pienso medicado, 12 mg flumequina/kg p.v./día, 5 días, a una temperatura del

agua de 18 °C, se ajusta adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose la siguiente ecuación exponencial:

$$C_p = 7,714 \times e^{-0,369t} + 0,100 \times e^{-0,038t} - 7,814 \times e^{-0,450t}$$

- 5) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la flumequina se absorbe rápidamente tras la administración múltiple oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día, 5 días, a una temperatura del agua de 18°C, con una semivida plasmática de absorción ( $t_{1/2a}$ ) de 1,542 h, alcanzándose una concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de 0,621 µg/ml en un tiempo ( $T_{max}$ ) de 2,573 h.
- 6) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la flumequina a dosis múltiple oral de 12 mg /kg p.v./día, durante 5 días, con una temperatura del agua de 18 °C, tras su absorción, se distribuye rápidamente con una semivida plasmática de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 1,880 h seguido de una eliminación lenta con una semivida plasmática de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de 18,396 h, detectándose niveles plasmáticos del antimicrobiano en un rango de 0,094 a 0,123 µg/ml hasta 12 horas pos-administración en los animales tratados.
- 7) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), la flumequina tras la administración múltiple oral de 12 mg flumequina kg p.v./día, durante 5 días, a una temperatura del agua de 18°C, no presenta acumulación y/o saturación en base a los parámetros de absorción  $C_{max}$  y AUC y también en base a la semivida plasmática de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) en comparación con los valores de estos parámetros obtenidos tras la administración de dosis única.

- 8) En función de los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético, teniendo en cuenta la integración PK/PD, se sugiere que en doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), un régimen de dosificación oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días, podría ser de valor terapéutico frente a enfermedades bacterianas comunes, tales como furunculosis y vibriosis aconsejándose no utilizar nunca dosis menores para minimizar el desarrollo de resistencias antimicrobianas.
- 9) En doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), el estudio de distribución y depleción tisular de la flumequina tras la administración múltiple oral de 12 mg flumequina /kg p.v./día, durante 5 días, a una temperatura del agua de 18°C, demuestra que la flumequina, se distribuye ampliamente encontrándose concentraciones altas de flumequina a las 3 h después de la última dosis en músculo + piel en proporciones naturales ( $1564,98 \pm 242,64 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Transcurridos 3, 8, 10 y 14 días después de la última dosis, se demuestra una depleción de estos residuos, detectándose concentraciones en músculo + piel de  $7,54 \mu\text{g}/\text{kg}$  a los 3 días después de la última dosis, e inferiores al límite de cuantificación de la técnica analítica a los 8, 10 y 14 días tras la última dosis.
- 10) Considerando el residuo marcador fijado flumequina, y tras aplicar el análisis estadístico de regresión lineal recomendado por la EMEA para calcular el tiempo de retirada, en nuestro estudio obtenemos un tiempo de retirada o de espera de 2 días para músculo + piel en proporciones naturales para asegurar el cumplimiento del LMR ( $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

11) Para el régimen de dosificación oral de 12 mg flumequina/kg p.v./día, durante 5 días, se recomienda para la protección del consumidor y como medida de seguridad alimentaria un tiempo de espera o retirada del medicamento previo al sacrificio de 2 días, que a una temperatura del agua de 18°C equivale a 19,08 grados-día, periodo de espera que aseguraría que las concentraciones de residuos de flumequina en el tejido estudiado (músculo + piel en proporciones naturales) fueran menores que el LMR establecido por la Unión Europea para esta especie acuícola de consumo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ADEL, R.A.A., HAMDY, A.A.A., ADEL, M.A.M., ABDEL-AZIZ, H.A. & FARID, M.A.H. (2000). Adverse testicular effects of some quinolone members in rats. *Pharmacological Research* **41**(2), 211-219.
- AKAHANE, K., SEKIGUCHI, M., UNE, T. & OSADA, Y. (1989). Structure-epileptogenicity relationship of quinolones with special reference to their interaction with  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**(10), 1704-1708.
- ALDERMAN, D.J. (1988). Fisheries chemotherapy : a review. In : *Recent Advances in Aquaculture*, Vol. 3. Muir, J.F. and Roberts, R.J. (Eds.) Timber Press, Portland, pp. 1-61.
- ANADÓN, A. (1992). Les fluoroquinolones: Aspects pharmacologiques et toxicologiques. *Bulletin de L'Academie Vétérinaire de France* **65**(2), 207-216.
- ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1992). Pharmacology and Toxicology of Quinolones. In: *Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. Sunshine, I. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 193-198.
- ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* **59**, 183-198.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., FERNÁNDEZ, M.C., DÍAZ, M.J. & BRINGAS, P. (1990). Effect of ciprofloxacin on antipyrine pharmacokinetics and metabolism in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**(11), 2148-2151.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., MARTÍNEZ, M.A., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M., ITURBE, J. & TAFUR, M. (1999). Pharmacokinetic variables and tissue residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in healthy pigs. *American Journal of Veterinary Research* **60**(11), 1377-1382.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & MARTÍNEZ, M.A. (2000a). Microsomal enzyme changes by fluoroquinolone and macrolide antibiotics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **23**(Suppl. 1), G3, 1-5.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., MARTÍNEZ, M.A. & DÍAZ, M.J. (2000b). Comparison of inhibitory effects of new quinolones on drug metabolizing activity in the liver. 1<sup>st</sup> International Symposium. The Discovery of New Veterinary Medicines. Pfizer Global Research & Development-Veterinary Medicines. Sandwich (U.K), November 20-23.

- ANADÓN, A., MARTINEZ, M.A., MARTINEZ, M., DE LA CRUZ, C., DIAZ, M.J. & MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2008). Oral bioavailability, tissue distribution and depletion of flumequine in the food producing animal, chicken for fattening. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 662–670.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & CASTELLANO, V. (2012). Regulatory aspects for the drugs and chemical used in food-producing animals in the European Union. In: *Veterinary Toxicology*. Gupta, R.C. (Eds). Oxford, pp. 135-155. Oxford Academic Press.
- ANDRIOLE, V.T. (1998). *The Quinolones*. Second Edition. London, Academic Press, pp. 417-418.
- AOUN, M., JACQUY, C., DEBUSSCHER, L., BRON, D., LEHERT, M. NOEL, P., VAN DER AUWERA, P. (1992). Peripheral neuropathy associated with fluoroquinolones (Letter). *The Lancett* **340**(8811), 127.
- ARCIERI, G., GRIFFITH, E., GRUENWALDT, G., HEYD, A., O'BRIEN, B., BECKER, N. & AUGUST, R. (1987). Ciprofloxacin: an update on clinical experience. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 381-386.
- ATEF, M., EL-GENDI, A.Y.I., EL-SAYED, M.G.A. & RAMADAN, A. (1987). Some pharmacokinetic and microbiologic aspects of flumequine in chickens. *Archives für Geflügelkunde* **51**(3), 88-92.
- AUSTIN, B. & AUSTIN, D.A. (1987). *Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish*. 15<sup>th</sup> Edn, Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, England.
- AUSTIN, B., RAYMENT, J. & ALDERMAN, D.J. (1983). Control of furunculosis by oxolinic acid. *Aquaculture* **31**, 101-108.
- AVENT, C.K., KRINSKY, D., KIRKLIN, J.K., BOURGE, R.C. & FIGG, W.D. (1988). Synergistic nephrotoxicity due to ciprofloxacin and cyclosporine. *American Journal of Medicine* **85**(3), 452-453.
- BAILLY, S., FAY, M., ROCHE, Y. & GOUGEROT-POCIDALO, M.A. (1990). Effects of quinolones on tumor necrosis factor production by human monocytes. *International Journal of Immunopharmacology* **12**(1), 31-36.
- BALL, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**(Topic T1), 17-24.
- BARAN, R. & BRUN, P. (1986). Photoonycholysis induced by the fluoroquinolones pefloxacin and ofloxacin. *Dermatologica* **173**(4), 185-188.
- BARNES, A.C., LEWIN, C.S., HASTINGS, T.S. & AMYES, S.G.B. (1990). *In vitro* activities of 4-quinolones against the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1819-1820.

BARNES, A.C., LEWIN, C.S., HASTINGS, T.S. & AMYES, S.G.B. (1991). *In vitro* susceptibility of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* to flumequine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**(12), 2634-2635.

BEDARD, J. & BRYAN, L. (1989). Interaction of the fluoroquinolone antimicrobial agents ciprofloxacin and enoxacin with liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**(8), 1379-1382.

BEDNARCZYK, E.M., GREEN, J.A., NELSON, A.D., LEISURE, G.A., LITTLE, D., ADLER, L.P., BERRIDGE, M.S., PANACEK, E.A. & MIRALDI, F.D. (1991). Comparison of the effects of temafloxacin, ciprofloxacin, or placebo on cerebral blood flow, glucose, and oxygen metabolism in healthy subjects by means of positron emission tomography. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **50**(2), 165-171.

BELLIDO, J.L.M., MANZANARES, M.A.A., GUIRAO, G.Y., ZUFIAURRUFÉ, M.N.G., TOLDOS, M.C.M., HERNÁNDEZ, M.S. & GARCIA-RODRIGUEZ, J.A. (1997). *In vitro* activities of 13 fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* isolates with characterized mutations in *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA* and against wild-type isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(4), 966-968.

BEM, J.L. & MANN, R.D. (1988). Danger of interaction between ciprofloxacin and theophylline. *British Medical Journal* **296**(6629), 1131.

BERTINO, Jr. J. & FISH, D. (2000). The safety profile of the fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics* **22**(7), 798-817.

BETRIU, C., GOMEZ, M., PALAU, M.L., SÁNCHEZ, A. & PICAZO, J.J. (1999). Activities of new antimicrobial agents (trovafloxacin, moxifloxacin, sanfetrinem, and quinupristin-dalfopristin) against *Bacteroides fragilis* group: comparison with the activities of 14 other agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(9), 2320-2322.

BJÖRKLUND, H.V. & BYLUND, G. (1990). Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* **84**, 363-372.

BLASER, J. & LUTHY, R. (1988). Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on *in-vitro* activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **22**(1), 15-22.

BLONDEAU, J.M. (1999). Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clinical Therapeutics* **21**(1), 3-40.

BLONDEAU, J.M. (2004). Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology* **49**(2), 73-78.

BOON, J.H., NOUWS, J.M.F., VAN DER HAIJDEN, M.H.T., BOOMS, G.H.R. & DEGEN, M. (1991). Disposition of flumequine in plasma of European eel (*Anguilla Anguilla*) after single intramuscular injection. *Aquaculture* **99**, 213-223.

- BOWLES, S.K., POPOVSKI, Z., RYBAK, M.J., BECKMAN, H.B. & EDWARDS, D.J. (1988). Effects of norfloxacin on theophylline pharmacokinetics at steady state. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**(4), 510-512.
- BRAUNER, G.J. (1975). Bullous photoreaction to nalidixic acid. *The American Journal of Medicine* **58**(4), 576.
- BROWN, S.A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**(1), 1-14.
- BROWN, L. (Ed.) (2000). *Acuicultura para Veterinarios: Producción y Clínica de Peces*. Pergamon Press Ltd., Acirbia, Zaragoza, España.
- BROWN, S.A., COOPER, J., GAUSE, J.J., GRECO, D.S., WISE, D.W. & BUCK, J.M. (1990). Pharmacokinetics of norfloxacin in dogs after single intravenous and single and multiple oral administrations of the drug. *American Journal of Veterinary Research* **51**(7), 1065-1070.
- BRÜHL V.P., GUNDLACH, G., WINTJES K., EICHNER, W. & BASTIAN, H.P. (1973). Neue untersuchungen zur pharmakokinetik der nalidixin-säure I. serum-und ürinpiegel bei normaler nierenfunktion. *Arzneimittel-Forschung-Forsch/Drug Research* **23**(9), 1311-1313.
- BRUUN, M.S., MADSEN, L. & DALSGAARD, I. (2003). Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different *in vitro* antibiotic susceptibilities. *Aquaculture* **215**, 11-20.
- BRYAN, L.E., BEDARD, J., WONG, S. & CHAMBERLAND, S. (1989). Quinolone antimicrobial agents: mechanism of action resistance development. *Clinical and Investigative Medicine* **12**(1), 14-19.
- BRYSKIER, A. & CHANTOT, J.F. (1995). Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* **49**(S2), 16-28.
- BURMAN, L.G. (1977). Apparent absence of transferable resistance to nalidixic acid in pathogenic Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **3**(5), 509-516.
- BUTLER, M.A., IWASAKI, M., GUENGERICH, F.P. & KADLUBAR, F.F. (1989). Human cytochrome P-450<sub>PA</sub> (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Biochemistry* **86**(20), 7696-7700.
- CAMBAU, E. & GUTMANN, L. (1993). Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs* **45**(S1), 15-23.

- CARLIER, M.B., SCORNEAUX, B., ZENEBERG, A., DESNOTTES, J.F. & TULKENS, P.M. (1990). Cellular uptake, localisation and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**(Suppl. B), 27-39.
- CARLUCCI, G. (1998). Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **812**(1-2), 343-367.
- CESTER, C.C., SCHNEIDER, M. & TOUTAIN, P. L. (1996). Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: enrofloxacin *versus* marbofloxacin. *Revue de Medecine Veterinaire* **147**(10), 703-716.
- CHEN, C.R., MALIK, M., SNYDER, M. & DRLICA, K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone induced ADN cleavage. *Journal of Molecular Biology* **258**(4), 627-37.
- CHEVALIER, R., GERARD, J.P. & MICHEL, C. (1981). Distribution et cinetique tissulaire de la flumequine chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Revue de Medecine Veterinaire* **132**, 831-837.
- CHRIST, W. (1990). Central nervous system toxicity of quinolones: human and animal findings. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**(Suppl. B), 219-225.
- CHRIST, W., GINDLER, K. & GRUENE, S. (1989). Interactions of quinolones with opioids and fembuten, a non steroidal antiinflammatory drug: involvement of dopaminergic neurotransmission. *Reviews of Infectious Diseases* **11**(Suppl. 5), 1393-1394
- CHRIST, W., LEHNERT, T. & ULBRICH, B. (1988). Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Reviews of Infectious Diseases* **10**(Suppl. 1), 141-146.
- CHU, D.T. & FERNANDES, P.B. (1989). Structure activity relationship of the fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**(2), 131-135.
- COCHET, P., GUYONET, J., BROMET-PETIT, M. & LECLERCQ, B. (1997). Quantitative tissue distribution study of (12-<sup>14</sup>C) flumequine using the whole-body autoradiography (QWBAR) after a single oral (12 mg/kg) administration to a chicken. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Spain*. P84, In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(Suppl. 1), 205-206.
- COHEN, J.S. (2001). Peripheral neuropathy associated with fluoroquinolones. *The Annals of Pharmacotherapy* **35**(12), 1540-1547.
- COOK, T., GOSS, W. & DEITZ, W. (1966). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. Possible mutagenic effect. *Journal of Bacteriology* **91**, 780-783.
- CORBETT, C., BENEDETTI, P. & BERGEL, J. (2007). Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 611 – 619.

- CORRADO, M.L., STRUBLE, W.E., PETER, C., HOAGLAND, V. & SABBAJ, J. (1987). Norfloxacin: review of safety studies. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 6B), 22-26.
- COSTENARO, L., GROSSMANN, J.G., EBEL, C. & MAXWELL, A. (2005). Small-angle X-Ray scattering reveals the solution structure of the full-length DNA gyrase A subunit. *Structure* **13**, 287–296.
- COWAN, S., GARAVITO, R., JANSONIUS, J., JENKINS, J., KARLSSON, R., KONIG, N., PAI, E.F., PAUPTIT, R., RIZKALLAH, J. & ROSENBAACH, J. (1995). The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure* **3**(10), 1041-1050.
- COZZARELLI, N.R. (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**(4434), 953-960.
- CRAIG, W.A. & DALHOFF, A. (1998). Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. In: *Handbook of experimental Pharmacology*. Born, G.V., Cuatrecas, D., Ganten, P., Herken, H. Melmon, K.L. & Starke, K. (Eds). Springer, Berlin, pp. 208-232.
- CURTIS, L.R., KEMP, C.J. & SVEC, A.V. (1986). Biliary excretion 14C-taurocholate by rainbow trout is stimulated at warmer acclimation temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* **84**(1), 87-90.
- DALHOFF, A. (1998). Pharmacokinetics of selected antibacterial agents. In: *Antibiotics and Chemotherapy*. Vol. 49. Schönfeld, H. Ed. Basel, Karger, pp 85-140.
- DALLA COSTA, T. & DERENDORF, H. (1996). AUC – a general target for the optimisation of dosing regimens of antibiotics? *The Annals of Pharmacotherapy* **30**, 1024–1031.
- DAVENPORT, C.L.M., BOSTON, R.C. & RICHARDSON, D.W. (2001). Effects of enrofloxacin and magnesium deficiency on matrix metabolism in equine articular cartilage. *American Journal of Veterinary Research* **62**(2), 160-166.
- DAVIES, B.I. & MAESEN, F.P.V. (1989). Drug interactions with quinolones. *Reviews of Infectious Diseases* **11**(Suppl. 5), 1083-1090.
- DAVIES, B.I., MAESEN, F.P.V., TEENGS, J.P. & BAUR, C. (1986). The quinolones in chronic bronchitis. *Pharmaceutisch Weekblad* **8**(1), 53-59.
- DE SARRO, A. & DE SARRO, G. (2001). Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Current Medicinal Chemistry* **8**(4), 371-384.
- DECOLIN, D. & NICOLAS, A. (1987). Determination of flumequine and its 7-hydroxy metabolite by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **414**(2), 499-503.

DELMAS, J.M., CHAPEL, A.M., GAUDIN, V. & SANDERS, P. (1997). Pharmacokinetics of flumequine in sheep after intravenous and intramuscular administration: bioavailability and tissue residue studies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(4), 249-257.

Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L136**, 30.4.2004.

Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 Noviembre 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L311**, 6.11.2001.

DODO, M., NAKATSUJI, K., MIURA, Y., HORI, M. FURUKAWA, K., OKA, M. & ITO, T. (1991). General pharmacology of sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent. (1) Effects on the central nervous system. *Ohyo Yakuri* **41**, 147-155.

DORRESTEIN, G.M., VAN GOGH, H., BUITELAAR, M.N. & NOUWS, J.F.M. (1983). Clinical pharmacokinetics of flumequine after intravenous, intramuscular and oral administration in pigeons (*Columba livia*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **6**(4), 281-292.

DOSSIN, O., GRUET, P. & THOMAS, E. (1998). Comparative field evaluation of marbofloxacin tablets in the treatment of feline upper respiratory infection. *Journal of Small Animal Practice* **39**(6), 286-289.

DOTEUCHI, M., OKA, M. & OHUCHI, T. (1980). Pharmacologic actions of cinoxacin on the respiratory and cardiovascular systems and smooth muscles. *Chemotherapy* **28**(S-4), 550-559.

DRLICA, K. & KREISWIRTH, B. (1994). 4-Quinolones and the physiology of DNA gyrase. *Advances in Pharmacology* **29**(A), 263-283.

DRLICA, K. & ZHAO, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Reviews* **61**(3), 377-392.

DRUGEON, H., THOMAS, V., GUILLARDEAU, L. & THOMAS, E. (1997). Antibacterial activity of marbofloxacin against bovine respiratory isolates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(Suppl. 1), 138-139.

DRUSANO, G.L. (2002). Pharmacodynamics of fluoroquinolones. In: Proceedings of the 10 ISAP symposium: Pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD). Towards definitive criteria, Milan, pp. 27-28.

DRUSANO, G.L., PLAISANCE, K., FORREST, A. & STANDIFORD, H.C. (1986). Dose ranging study and constant infusion evaluation of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**(3), 440-443.

- DRUSANO, G.L., JOHNSON, D.E. & ROSEN, M. (1993). Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**(3), 483-490.
- DUDLEY, M.N. (1991). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *American Journal of Medicine* **91**(S6), 45-50.
- EDWARDS, D.J., BOWLES, S.K., SVENSSON, C.K. & RYBAK, M.J. (1988). Inhibition of drug metabolism by quinolone antibiotics. *Clinical Pharmacokinetics* **15**(3), 194-204.
- EGERBACHER, M., EDINGER, J. & TSCHULENK, W. (2001). Effects of enrofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture. *American Journal of Veterinary Research* **62**(5), 704-708.
- EGERBACHER, M., SEIBERL, G., WOLFESBERGER, B. & WALTER, I. (2000). Ciprofloxacin causes cytoskeletal changes and detachment of human and rat chondrocytes in vitro. *Archives of Toxicology* **73**(10-11), 557-563.
- ELEMA, M.O., HOFF, K.A. & KRISTENSEN, H.G. (1994). Multiple-dose pharmacokinetic study of flumequine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **128**, 1-11.
- ELEMA, M.O., HOFF, K.A. & KRISTENSEN, H.G. (1995). Bioavailability of flumequine after oral administration to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **136**, 209-219.
- ELIOPOULOS, G.M. (1999). Activity of newer fluoroquinolones *in vitro* against Gram-positive bacteria. *Drugs* **58**(Suppl. 2), 23-28.
- ELLINGSEN, O.F., MIDTTUN, B., ROGSTAD, A., SYVERTSEN, C. & SAMUELSEN, O.B. (2002). Dosage regime experiments with oxolinic acid and flumequine in atlantic salmon (*Salmo salar* L) held in seawater. *Aquaculture* **209**, 19-34.
- ELLIS, A.E., ROBERTS, R.J. & TYLER, P. (1978). The anatomy and physiology of teleost. In: *Fish Physiology*. Roberts, R.J (Ed.), Balliere Tindall, London, pp. 13-54.
- ELSTON, R.A. & TAYLOR, J. (1988). Possible interaction of ciprofloxacin with cyclosporin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **21**(5), 679-680.
- EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1998). Guideline on validation of analytical procedures: Methodology, EMEA/VICH/591/98 FINAL. December 1998, London, UK
- EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1999). Flumequine. Summary report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/624/99-FINAL, July 1999, London, UK.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (2002). Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods- Update application software. EMA/CVMP/563/02-FINAL, May 2002, London, UK.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (2008). Guideline on demonstration of target animal safety and efficacy of veterinary medicinal products intended for use in farmed finfish. EMA/CVMP/EWP/459868/2008-CONSULTATION, October 2009, London, UK.

ENDZT, H.P., RUIJS, G.J., VAN KLINGEREN, B., JANSEN, W.H., VAN DER EAYDEN, t. & MOUTON, R.P. (1991). Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **27**, 199-208.

FANOS, V. & CUZZOLIN, L. (2000). Fluoroquinolones in pediatrics and their nephrotoxicity in adults: Minireview. *Journal of Chemotherapy* **12**(3), 228-231.

FAO. (2010). The state of world fisheries and aquaculture 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, Rome.

FELMINGHAM, D., O'HARE, M.D., ROBBINS, M.J., WALL, R.A., WILLIAMS, A.H., CREMER, A.W., RIDWAY, G.L. & GRÜNEBERG, R.N. (1985). Comparative in vitro studies with 4-quinolone antimicrobials. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* **XI**(5), 317-329

FERGUSON, J. (1995). Fluoroquinolone photosensitization: a review of clinical and laboratory studies. *Photochemistry and Photobiology* **62**(6), 954-958.

FERRERO, L., CAMERON, B. & CROUZET, J. (1995). Analysis of *gyrA* and *grrA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(7), 1544-1558.

FILLASTRE, J.P., LEROY, A., MOULIN, B., DHIB, M., BORSA-LEBAS, F. & HUMBERT, G. (1990). Pharmacokinetics of quinolones in renal insufficiency. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**(Suppl. B), 51-60

FISH, N.D. (2001). Fluoroquinolone effects adverse and drugs interactions. *Pharmacotherapy* **21**(10 Pt 2), 253-272.

FITTON, A. (1992). The quinolones. An overview of their pharmacology. *Clinical Pharmacokinetics* **22**(Suppl. 1), 1-11.

FLOR, S., GUAY, D.R.P., OPSAHL, J.A., TACK, K. & MATZKE, G.R. (1990). Effects of magnesium-aluminium hydroxide and calcium carbonate antacids on bioavailability of ofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**(12), 2436-2438.

FORREST, A., NIX, D.E., BALLOW, C.H., GOSS, T.F., BIRMINGHAM, M.C. & SCHENTAG, J.J. (1993). Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**(5), 1073-1081.

- FÖRSTER, C., KOCIOK, K., SHAKIBAEI, M., MERKER, H.J. & STAHLMANN, R. (1996). Quinolone-induced cartilage lesions are not reversible in rats. *Archives of Toxicology* **70**(8), 474-481.
- FÖRSTER, C., RÜCKER, M., SHAKIBAEI, M., BAUMANN-WILSCHKE, I., VORMANN, J. & STAHLMANN, R. (1998). Effects of fluoroquinolones and magnesium deficiency in murine limb bud cultures. *Archives of Toxicology* **72**(7), 411-419.
- FOURNIER, B., ZHAO, X., LU, T., DRLICA, K. & HOOPER, D. (2000). Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: Different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(8), 2160-2165.
- FOURTILLAN, J.B., GRANIER, J., SAINT-SALVI, B., SALMON, J., SURJUS, A., TREMBLAY, D., VINCENT DU LAURIER, M. & BECK, S. (1986). Pharmacokinetics of ofloxacin and theophylline alone and in combination. *Infection* **14**(Suppl. 1), 67-69.
- FUHR, U., WOLFF, T., HARDER, S., SCHYMANSKI, P. & STAIB, A.H. (1990). Quinolone inhibition of the cytochrome P450-dependent caffeine metabolism in human liver microsomes. *Drug Metabolism Disposition* **18**(6), 1005-1010.
- FUHR, U., ANDERS, E.M., MAHR, G., SÖRGEL, F. & STAIB, A.H. (1992). Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**(5), 942-948.
- FURUHAMA, K., AKAHANE, K., TAWARA, K. & TAKAYAMA, S. (1992). Interaction of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin with fembuten in mice. *Arzneimittel-Forschung-Forsch* **43**(3A), 406-408.
- GEDDES, A.M. (1993). Safety of fleroxacin in clinical trials. *American Journal of Medicine* **94**(Suppl. 3A), 201S-203S.
- GELATT, K.R., VAN DER WOERDT, A., KETRING, K.L., ANDREW, S.E., BROOKS, D.E., BIROS, D.J., DENIS, H.D. & CUTLER, T.J. (2001). Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. *Veterinary Ophthalmology* **4**(2), 99-106.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M.H. & NASH, H.A. (1976). DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**, 3872-3876.
- GERDING, D.N. & HITT, J.A. (1989). Tissue penetration of the new quinolones in humans. *Reviews of Infectious Diseases* **11**(Suppl. 5), 1046-1057.
- GIBALDI, M., NAGASHIMA, R. & LEVY, G. (1969). Relationship between drug concentration in plasma or serum and amount of drug in the body. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 193-197.

- GIGOSOS, P.G., REVESADO, P.R., CADAHIA, O., FENTE, C.A., VAZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M. & CEPEDA, A. (2000). Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A* **871**(1-2), 31-36.
- GILES, C.J., MAGONIGLE, R.A., GRIMSHAW W.T.R., TANNER, A.C., RISK, J.E., PRESCOTT, J.F., LYNCH, M.J. & RICE, J.R. (1991). Clinical Pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **14**(4), 400-410.
- GONZALEZ, J.P. & HENWOOD, J.M. (1989). Pefloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics properties and therapeutic use. *Drugs* **37**(5), 628-668.
- GOOTZ, T.D. & MCGUIRK, P.R. (1994). New quinolones in development. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **3**(2), 93-114.
- GRAVE, K., ENGELSTAD, M., SØLI, N.E. & HÅSTEIN, T. (1990). Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture* **86**, 347-358.
- GRAVE, K., MARKESTAD, A. & BANGEN, M. (1996). Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980-1988 and 1989-1994. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 184-191.
- GRIGGS, D.J. & WISE, R. (1989). A simple isocratic high-pressure liquid chromatographic assay of quinolones in serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **24**(3) 437-445.
- GRUBBER, G., JAEHDE, U., SÖRGEL, F., HEISS, R. & SCHUNACK, W. (1988). Relationships between the chemical structure and the HPLC capacity factor of gyrase inhibitors and their metabolites in different methanol-water eluents. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* **330**, 388-389.
- GUICHARD, B. & LICEK, E. (2006). A comparative study of antibiotics registered for use in farmed fish in European countries. Poster presented at the First OIE Global Conference on Aquatic Animal Health, 10 October 2006, Bergen, Norway.
- GUYONET, J., PACAUD, M., RICHARD, M., DOISI, A., SPAVONE, F. & HELLING, P.H. (1996). Routine determination of flumequine in kidney tissue of pig using automated liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **679**(1-2), 177-184.
- GUYONET, J., PACAUD, M., DOISI, A., SPAVONE, F. & HELLING, P.H. (1997). Residue depletion of flumequine after a continuous oral administration via drinking water in broilers. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Spain*. P85, In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(Suppl. 1), 206-207.

- HALLIWELL, R.F., DAVEY, P.G. & LAMBERT, J.J. (1991). The effects of quinolones and NSAIDs upon GABA-evoked currents recorded from rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **27**(2), 209-218.
- HANNAN, P.C.T., O'HANLON, P.J. & ROGERS, N.H. (1989). In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Research in Veterinary Science* **46**(2), 202-211.
- HANSEN, M.K. & HORSBERG, T.E. (1999). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**, 122-126.
- HANSEN, M.K. & HORSBERG, T.E. (2000a). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in the eel (*Anguilla Anguilla*) after intravascular, oral and bath administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **23**, 169-174.
- HANSEN, M.K. & HORSBERG, T.E. (2000b). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in cod (*Gadus morhua*) and goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **23**, 163-168.
- HARRISON, L.I., SCHUPPAN, D., ROHLING, S.R., HANSEN, A.R., HANSEN, C.S., FUNK, M.L., COLLINS, S.H. & OBER, R.E. (1984). Determination of flumequine and a hydroxy metabolite in biological fluids by high-pressure liquid chromatographic fluorometric, and microbiological methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **25**(3), 301-305.
- HARRISON, L.I., SCHUPPAN, D., ROHFLING, S.R., HANSEN, A.R., GESTER, J.F., HANSEN, C.S., FUNK, M.L. & OBER, R.E. (1986). Disposition of radiolabeled flumequine in rat and dog. *Drug Metabolism and Disposition* **14**(5), 555-558.
- HAUG, T. & HALS, P.A. (2000). Pharmacokinetics of oxytetracycline in Artic charr (*Salvelinus alpinus L.*) in fresh water at low temperature. *Aquaculture* **186**, 175-191.
- HAZEL, J.R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *American Journal of Physiology* **246**, 460-470.
- HEDENMALM, K., SPIGSET, O. (1996). Peripheral sensory disturbances related to treatment with fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**(4), 831-837.
- HILDEBRAND, H., KEMPKA, G., SCHLÜTER, G. & SCHMIDT, M. (1993). Chondrotoxicity of quinolones in vivo and in vitro. *Archives of Toxicology* **67**(6), 411-415.
- HIRAI, K., AOYAMA, H., SUZUE, S., IRIKURA, T., IYOBE, S. & MITSUHASHI, S. (1986a). Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**(3), 535-538.

- HIRAI, K., AOYAMA, H., SUZUE, S., IRIKURA, T., IYOBE, S. & MITSUHASHI, S. (1986b). Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**(2), 248-253.
- HIRAI, S., HIRAIWA, T., ARAI, H., ONO, S., TANAKA, K., HASHIBA, K., NAKADA, Y., GODEN, K., TANADA, K., MAEKAWA, M., FURUHATA, K., MAKINO, S. & KITAMURA, K. (1989). General pharmacology of T-3262, a new pyridonecarboxylic acid. *The Japanese Journal of Antibiotics* **42**(4), 831-853.
- HÖFFKEN, G., BORNER, K., GLATZEL, P.D., KOEPE, P. & LODE, H. (1985). Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids. *European Journal of Clinical Microbiology* **4**(3), 345.
- HOIE, S., MARTINSEN, B., SOHLBERG, S. & HORSBERG, T.E. (1994). Sensitivity patterns of Norwegian clinical isolates of *Aeromonas salmonicida* susp. *Salmonicida* to oxolinic acid, flumequine, oxytetracycline, and sulphadiazine/trimethoprim. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **12**, 142-144.
- HOOPER, D.C. (1995). Quinolones. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E. & DOLIN, R. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone, pp. 364-376.
- HOOPER, D.C. (1998). Clinical applications of quinolones. *Biochimica et Biophysica Acta* **1400**(1-3), 45-61.
- HOOPER, D.C. (2001). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* **31**(S2), 24-28.
- HOOPER, D.C. & WOLFSON, J.S. (1991). Mode of action of new quinolones: new data. *European Journal of Clinical Microbiology* **10**(4), 223-231.
- HOOPER, D.C. & WOLFSON, J.S. (1993). Mechanism of bacterial resistance to quinolones. In: HOOPER, D.C. & WOLFSON, J.S., 2<sup>nd</sup>. Ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 97-118.
- HOOPER, D.C., WOLFSON, J.S., EY, N.G. & SWART, M.N. (1987). Mechanism of action and resistance to ciprofloxacin. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 12-20.
- HORII, S., YASUOKA, C. & MATSUMOTO, M. (1987). High performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acid in cultured fish. *Journal of Chromatography* **388**(2), 459-461.
- HORSBERG, T.O. & BERGE, G.N. (1986). Pharmacotherapeutics in fish farming. *Norsk Veterinaertidsskrift* **98**(11), 805-812.
- HOSHINO, K., KITAMURA, A., MORRISSEY, I., SATO, K., KATO, J. & IKEDA, I. (1994). Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**(11), 2623-2627.

- HOWARD, B.M.A., PINNEY, R.J. & SMITH, J.T. (1993). Function of SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **45**(7), 658-662.
- HUNDT H.K. & BARLOW, E.C. (1981). Thin-layer chromatographic method for the quantitative analysis of nalidixic acid in human plasma. *Journal of Chromatography* **223**(1), 165-172.
- HUNN, J.B. (1982). Urine flow rate in freshwater salmonids: a review. *Progressive Fish-Culturist* **44**, 119-126.
- HUSTVEDT, S.O., SALTE, R. & VASSVIK, V. (1992). Combatting cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with oxolinic acid: a case report. *Aquaculture* **103**, 213-219.
- HYATT, J.M., Mc KINNON, P.S., ZIMMER, G.S. & SCHENTAG, J.J. (1995). The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. *Clinical Pharmacokinetics* **28**(2), 143-160.
- IHRKE, P.J., PAPICH, M.G. & DEMANUELLE, T.C. (1999). The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology* **10**(3), 193-204.
- INGHAM, B., BRETNALL, D.W., DALE, E.A. & McFADZEAN, J.A. (1977). Arthropathy induced by antibacterial fused N-alkyl-4-pyridone-3-carboxylic acid. *Toxicology Letters* **1**, 21-26.
- ISOZAKI, T. & MATSUNO, Y. (1971). Pharmacological studies on piromidic acid. *Chemotherapy* **19**, 394-403.
- JACOBS-REITSMA, W.F., KAN, C.A. & BOLDER, N.M. (1994). The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 228-231.
- JADOUL, M., PIRSON, Y., VAN YPERSELE DE STRIHOUCHE, C., (1989). Norfloxacin and cyclosporine: a safe combination. *Transplantation* **47**(4), 747-748.
- JANKNEGT, R. (1990). Drug interaction with quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**(Suppl. D), 7-29.
- JOLSON, H.M., TANNER, L.A., GREEN, L. & GRASELA, T.H. Jr. (1991). Adverse reaction reporting of interaction between warfarin and fluoroquinolones. *Archives of Internal Medicine* **151**(5), 1003-1004.
- JOOS, B., LEDERGERBER, B., FLEPP, M., BETTEX, J.D., LÜTHY, R. & SIEGENTHALER, W. (1985). Comparison of high-pressure liquid chromatography and bioassay for determination of ciprofloxacin in serum and urine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**(3), 353-356.

- KATO, J., NISHIMURA, R. & HIROTA, M. (1988). Gene organization in the region containing a new gen involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**, 3967-3977.
- KATO, J., NISHIMURA, R., NIKI, H., HIGARA, S. & SUSUKI, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell* **63**(2), 393-404.
- KECK, G. & BORNE, P.M. (1995). Nouvelles conceptions en antibiothérapie et leurs applications pratiques en médecine vétérinaire. *Revue de Médecine Vétérinaire* **146**, 309-320.
- KHODURSKY, A.B. & COZZARELLI, N.R. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *The Journal of Biological Chemistry* **273**(42), 27668-27677.
- KHODURSKY, A.B., PETER, B. J., SCHMID M.B., DERISI, J., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O. & COZZARELLI, N.R. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: Use of DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(17), 9419-9424.
- KIM, J.C., YUN, H.I., SHIN, H.C., HAN, S.S. & CHUNG, M.K. (2000). Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats. *Archives of Toxicology* **74**(2), 120-124.
- KITAMURA, A., HOSINO, K., KIMURA, Y., HAYAKAWA, I. & SATO, K. (1995). Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA girase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(7), 1467-1471
- KLEINOW, K.M., JARBOE, H.H. & SHOEMARKER, K.E. (1994). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **51**, 1205-1211.
- KOJIMA, H., HIROHASHI, M., SAKURAI, T., KASAI, Y. & AKASHI, A. (1984). General pharmacology of DL-8280. *Chemotherapy* **32**(S-1), 1148-1161.
- KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, M., KOUNENIS, G. & ELEZOGLOU, V. (1995). Inhibitory effects of flumequine, enoxacin and norfloxacin on the GABA-induced contractile effect on the Guinea pig ileum. *General Pharmacology* **26**(6), 1391-1395.
- KRUGER, H.U., SCHULER, U., PROKSCH, B., GOBEL, M. & EHNINGER, G. (1990). Investigation of potential interaction of ciprofloxacin with cyclosporine in bone marrow transplant recipients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**(6), 1048-1052.
- KÜNG, K., RIOND, J.L. & WANNER, M. (1993). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **16**(4), 462-468.

- LACARELLE, B., BLIN, O., AUDEBERT, C.A., AUQUIER, P., KARSENTY, H., HORRIERE, F. & DURAND, A. (1994). The quinolone, flumequine, has no effect on theophylline pharmacokinetics. *European Journal of Clinical Pharmacology* **46**(5), 477-478.
- LACY, M.K., LU, W., XU, X., TESSIER, P.R., NICOLAU, D.P., QUINTILIANI, R. & NIGHTINGALE, C.H. (1999). Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* model of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 672-677.
- LAGANA, A., MARINO, A., ROTATORI, M., CURINI, L., DASCENZO, G. & MIANO, L. (1988). High-performance liquid chromatography analysis of norfloxacin in humans tissue and plasma with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* **417**(1), 135-142.
- LE BEL, M., VALLEE, F. & BERGERON, M.G. (1986). Tissue penetration of ciprofloxacin after single and multiple doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**(3), 501-505.
- LECOEUR-BITCHATCHI, S. & KOLF-CLAUW, M. (1999). Les nouvelles quinolones en Médecine Vétérinaire. *Recueil de Médecine Vétérinaire* **175**(1-2), 7-15.
- LEDO, A., DOPAZO, C.P., ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E. & BARJA, J.L. (1987). Effectiveness of different chemotherapeutic agents for controlling bacterial fish diseases. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **7**(1), 20-22.
- LEES, P. & ALIABADI, F.S. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs; animals versus humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 269-284.
- LEMELAND, J.F., ROGEZ, J. P. & HUMBERT, G. (1981). Les nouvelles quinolones. *Revue de Médecine Thérapeutique* **3**, 121-126.
- LESHER, G.Y., FROELICH, E.D., ERNET, M.D., BAILY, J.H. & BRUNDAGE, R.P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* **5**, 1063-1068.
- LINVILLE, D., EMORY, C. & GRAVES, L. (1991). Ciprofloxacin and warfarin interaction. *The American Journal of Medicine* **90**, 765.
- LISTER, P.D. & SANDERS, C.C. (1999a). Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* **43**(1), 79-86.
- LISTER, P.D. & SANDERS, C.C. (1999b). Pharmacodynamics of trovafloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(5), 1118-1123.
- LITTLE, J.W. & MOUNT, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**, 11-22.

LLOYD, D.H., LAMPORT, A.I., NOBLE, W.C. & HOWELL, S.A. (1999). Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Dermatology* **10**(3), 249-251.

LODE, H. (2001). Evidence of different profiles of side effects and drug-drug interactions among the quinolones-the pharmacokinetic standpoint. *Chemotherapy* **47**(Suppl. 3), 24-31.

LODE, H., BORNER, K. & KOEPPE, P. (1998). Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* **27**(1), 33-39.

LODE, H., HÖFFKEN, G., BORNER, K. & KOEPPE, P. (1989). Unique aspects of quinolone pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* **16**(Suppl. 1), 1-4

LUDWIG, E., GRABER, H., PERENYI, T. & BENESCH, L. (1975). Examinations of drug interactions with nalidixic and oxolinic acids. *Orvosi Hetilap* **116**(50), 2947-2948.

LUDWIG, E., SZEKELY, E., CSIBA, A. & GRABER, H. (1988). The effect of ciprofloxacin on antipyrine metabolism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **22**(1), 61-67.

MADARAS-KELLY, K.J., OSTERGAARD, B.E., BAEKER HOVDE, L. & ROTSCHAFFER, J.C. (1996). Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**(3), 627-632.

MAESEN, F.P.V., TEENGES, J.P., BAUR, C. & DAVIES, B.I. (1984). Quinolones and raised plasma concentrations of theophylline. *The Lancet* **2**(8401), 530.

MALVISI, J., DELLA ROCA, G., ANFOSSI, P. & GIORGETTI, G. (1997). Tissue distribution and depletion of flumequine after in-feed administration in sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **157**, 197-204.

MANOHARAN, M., JAEHDE, U., KOCH, H.U., MALTER, U., NABER, K. & SORGEL, F. (1988). High-performance liquid chromatographic assays for gyrase inhibitors in plasma, urine, several body fluids, and tissues. *Reviews of Infectious Diseases* **10**(Suppl. 1), S98-S100.

MARIANS, K.J. & HIASA, H. (1997). Mechanism of quinolone action. *Journal of Biological Chemistry* **272**(14), 9401-9409.

MARSHALL, J.H. & PIDDOCK, L.J.V. (1994). Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**(4), 465-483.

MARTÍNEZ, M.A., DÍAZ, M.J., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., MARTÍNEZ, M., FREJO, M.T., TAFUR, M. & ANADÓN, A. (1999). Effects of fleroxacin on testosterone oxidation catalyzed by hepatic microsomes from male Wistar rats. *Methods and Findings in Experimental Pharmacology* **21**(Suppl. A), 184.

MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., MARTÍNEZ, M.A., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M., TAFUR, M. & ANADÓN, A. (1998). Inhibition of the cytochrome P4501A, P4502B and P4503A subfamilies in the liver of rats treated with fleroxacin. *British Journal of Pharmacology, Proceedings Supplement* **124**, 39.

MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., MARTÍNEZ, M.A., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M., TAFUR, M. & ANADÓN, A. (1999). Changes in cytochrome P450 isoenzymes by new fluoroquinolones. *British Journal Pharmacology, Proceedings Supplement* **128**, 276.

MARTISEN, B. & HOSGERG, T.E. (1995). Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin and enrofloxacin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10°C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(5), 1059-1064.

MARTISEN, B., OPPEGAARD, H., WISHSTROM, R. & MYHR, E. (1992). Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracyclin against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1738-1743.

MARZO, A & DAL BO, L. (1998). Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetics applications. *Journal of Chromatography* **812**(1-2), 17-34.

MATSUNO, Y., SOHJI, Y. & SHIMIZU, M. (1975). Pharmacological studies on pipemidic acid. *Chemotherapy* **23**, 2671-2684.

MATSUNO, Y., TAIRA, N. & KADOKAWA, T. (1984). General pharmacological properties of AT-2266. *Chemotherapy* **32**(Suppl. 3), 164-184.

MAXWELL, A. & CRITCHLOW, S. (1998). Mode of action. In: *Quinolone Antibacterials*. Kuhlman, J. & Zeiler, H.J. (Eds). Berlin, pp. 119-166.

MAYER, D.G. (1987). Overview of toxicological studies. *Drugs*, **34**(Suppl. 1), 150-153.

McCHESNEY, E.W., FROELICH, E.J., LESHER, G.Y., CREIN, A.V.R. & ROSI, D. (1964). Absorption, excretion and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **61**, 292-309.

MEIJER, B.A., CEYSSSENS, K.G.F., DE JONG, W.TH. & DE GRÈVE, B.I.A.C. (1994). Bioavailability of flumequine after semisimultaneous administration to veal calves. *Pharmaceutical Research* **11**(1), 117-121.

MEINEN, J.B., McCLURE, J.T. & ROSIN, E. (1995). Pharmacokinetic of enrofloxacin in clinically normal dogs and mice with *Escherichia coli* and staphylococcal infection. *American Journal of Veterinary Research* **56**(9), 1219-1224.

- MEVIUS, D.J., BREUKINK, P., GUELEN, P.J.M., JANSEN, T. & DE GRÈVE, B. (1990a). Pharmacokinetics, metabolism and renal clearance of flumequine in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **13**(2), 159-169.
- MEVIUS, D.J., BREUKINK, P. & VAN MIERT, A.S.J.P.A. (1990b). *In vitro* activity of flumequine in comparison with several pathogens isolated in calves in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* **12**(4), 212-220.
- MIZUKI, Y., FUJIWARA, I. & YAMAGUCHI, T. (1996). Pharmacokinetics interactions related to the chemical structures of fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**(Suppl. A), 41-55.
- MONTAY, G. & TASSEL, J.P. (1985). Improved high-performance liquid chromatographic determination of pefloxacin and its metabolite norfloxacin in human plasma and tissue. *Journal of Chromatography* **339**(1), 214-218.
- MORIKAWA, K., HASHIMOTO, S., IWANAGA, Y., YAMAHUCHI, T. & YAMAZAKI, M. (1988a). General pharmacology of NY-198 I. Effects of the central nervous system, respiration and cardiovascular system. *Chemotherapy* **36**(Suppl. 2), 265-283.
- MORIKAWA, K., HASHIMOTO, S., IWANAGA, Y., MAKINO, E. & YAMAZAKI, M. (1988b). General pharmacology of NY-198 II. Effects of autonomic nervous system, peripheral nervous system and others. *Chemotherapy* **36**(Suppl.2), 284-299.
- MORTON, S.J., SHULL, H.V. & DICK, J.D. (1986). Determination of norfloxacin and ciprofloxacin concentrations in serum and urine by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**(2), 325-327.
- MURAYAMA, S., HIRAI, K., ITO, A., ABE, Y. & IRIKURA, T. (1981). Studies on absorption, distribution and excretion of AM-715 in animals by bioassay method. *Chemotherapy (Tokyo)* **29**(Suppl. 4), 98-104.
- MURAYAMA, S., HARA, Y., ALLY, A., SUZUKI, T. & TAMAGAWA, M. (1992). Central stimulation effect of the combination of the new quinolone group of antimicrobial and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mice. *Folia Pharmacological Japannesse* **99**(1), 13-18.
- NAKAMURA, S. (1995). Veterinary use of new quinolones in Japan. *Drugs* **49**(Suppl. 2), 152-158.
- NAORA, K., KATAGIRI, Y., ICHIKAWA, N., HAYASHIBARA, M. & IWAMOTO, K. (1991). Enhanced entry of ciprofloxacin into the rat central nervous system induced by fembuten. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **258**(3), 1033-1037.
- NEU, H.C. (1989). The quinolones. *Infectious Disease Clinics of North America* **3**(3), 625-639.

- NEU, H.C., KUMADA, T., CHIN, N.X. & MANDELL, W. (1987). The post antimicrobial suppressive effects of quinolone agents. *Drugs in Experimental and Clinical Research* **13**(2), 63-67.
- NEUMAN, M. (1978). Flumequine. *Drugs Today* **14**, 365-566.
- NEUMAN, M. (1988). Clinical pharmacokinetics of the newer 4-quinolones. *Clinical Pharmacokinetics* **14**(2), 96-121.
- NIKAIDO, H. & THANASSI, D.G. (1993). Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**(7), 1393-1399.
- NIKI, Y., SOEJIMA, R., KAWANE, H., SUMI, M. & UMEKI, S. (1987). New synthetic quinolone antibacterial agents and serum concentration of theophylline. *Chest* **92**(4), 663-669.
- NILSSON-EHLE, I. (1987). Assay for ciprofloxacin and norfloxacin in serum and urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **416**(1), 207-211.
- NIX, D.E. & SCHENTAG, J.J. (1988). The quinolones: an overview and comparative appraisal of their pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Clinical Pharmacology* **28**(2), 169-178.
- NORRBY, S.R. (1991). Side-effects of quinolones: comparisons between quinolone and other antibiotics. *European of Clinical Microbiological Infectious diseases* **10**(4), 378-383.
- NOZAKI, M., TANAKA, K., TAKEDA, N., NIWA, M., KOHNO, K., KOBAYASHI, M. & TSURUMI, K. (1991). Neuro excitability of sparfloxacin, a novel quinolone antibacterial drug, in combination with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chemotherapy* **39**, 167-174.
- O'GRADY, P. MOLONEY, M. & SMITH, P.R. (1988). Bath admisnitration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout *Salmo trutta* and Atlantic salmon *S.salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* **4**, 27-33.
- OHKUBO, H., SEGAWA, M., HIRAYAMA, T. & NISHINO, K. (1981). Pharmacological studies on AM-715 : Influences of AM-715 on central nervous system, peripheral nervoussystem and smooth muscle organs. *Chemotherapy* **29**(S-4), 965-984.
- OLIPHANT, C.M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician* **65**(3), 455-464.
- OOIE, T., TERASAKI, T., SUZUKI, H. & SUGIYAMA, Y. (1997). Quantitative brain microdialysis study on the mechanism of quinolones distribution in the central nervous system. *Drug Metabolism and Disposition* **25**(7), 784-789.

- ORTEGA, A. (2008). *Cuadernos de acuicultura: Cultivo de dorada (Sparus aurata)*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.
- OTTAVIANI, D., BACCHIOCCHI, I., MASINI, L., LEONI, F., CARRATURO, A., GIAMMARIOLI, M. & SBARAGLIA, G. (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**(2), 135-140.
- PAPICH, M.G. (1998) Antibacterial drug therapy, focus on new drugs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **28**(2), 215-231.
- PATON, J.H. & REEVES, D.S. (1991), Clinical features and management of adverse effects of quinolone antibacterial. *Drug Safety* **6**(1), 8-27.
- PATTERSON, D.R. (1991). Quinolone toxicity: methods of assessment. *The American Journal of Medicine* **91**(Suppl. 6A), 35S-37S.
- PETRI, H. & TRONNIER, H. (1986). Efficacy of enoxacin in the treatment of bacterial infections of the skin with regards to photosensitisation. *Infection* **14**(Suppl. 3), S213-S216.
- PHILLIPS, I., CULEBRAS, E., MORENO, F. & BAQUERO, F. (1987). Induction SOS responses by new 4-quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **20**, 631-638.
- PIDDOCK, J.J.V. (1995). Mechanism of resistance to fluoroquinolones: State-of-the-art 1992-1994. *Drugs* **49**(Suppl 2), 29-35.
- PIDDOCK, L. & WISE, R. (1987). Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiology Letters* **41**, 289-294.
- PLAKAS, S.M., EL SAID, K.R. & MUSSER, S. M. (2000). Pharmacokinetics, tissue distribution and metabolism of flumequine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **187**, 1-14.
- POLK, R. (1989). Drug-drug interaction with ciprofloxacin and other fluoroquinolones. *The American Journal of Medicine* **87**(Suppl. 5A), 76-81.
- POULIQUEN, H. & MORVAN, M.L. (2002). Determination of residues of oxolinic acid and flumequine in freeze-dried salmon muscle and skin by HPLC with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants* **19**(3), 223-231.
- POWER, E.G. & PHILLIPS, I. (1993). Correlation between umuC induction and *Salmonella* mutagenicity assay for quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiology Letters* **112**(3), 251-254.
- PRESCOTT, J.F. & BAGOTT, J.D. (1993). *Antimicrobial Agents Veterinary Medicine*. Second Edition. Ames, Iowa State University Press, pp. 146-254.

PRESCOTT, J.F. & YIELDING, K.M. (1990). *In vitro* susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Canadian Journal of Veterinary research* **54**(1), 195-197.

PRINCE, R.A., CASABAR, E., ADAIR, C.G., WEXLER, D.B., LETTIERI, J. & KASIK, J.E. (1989). Effect of quinolone antimicrobial on theophylline pharmacokinetics. *Journal of Clinical Pharmacology* **29**(7), 650-654.

RAEMDONCK, D.L., TANNER, A.C., TOLLING, S.T. & MICHENER, S.L. (1992). *In vitro* susceptibility of avian *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* to danofloxacin and five other antimicrobials. *Avian Diseases* **36**(4), 964-967.

RAOOF, S., WOLLSHLAGER, C. & KHAN, F.A. (1987). Ciprofloxacin increases serum levels of theophylline. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 115-118.

REECE, R. & MAXWELL, A. (1991). DNA gyrase: Structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **25**(3), 335-375.

REGLAMENTO (CEE) nº 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 224**, 18.8.1990.

REGLAMENTO (CE) No 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 31**, 1.02.2002.

REGLAMENTO (CE) No 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 136**, 30.4.2004.

REGLAMENTO (CE) No 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 191**, 28.5.2004.

REGLAMENTO (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n o 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n o 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 152**, 16.6.2009.

REGLAMENTO (UE) n° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 015**, 20.1.2009.

REIMSCHUESSEL, R., STEWART, L., SQUIBB, E., HIROKAWA, K., BRADY, T., BROOKS, D., SHAIKH, B. & HODSDON, C. (2005). Fish drug analysis - Fish-Pharm: A searchable database of pharmacokinetics data in fish. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* **7**(2), 288-327.

RIGOS, G., TYPERNOU, A., NENGAS, I. & ALEXIS, M. (2002). A pharmacokinetic study of flumequine in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), after a single intravascular injection. *Journal of Fish Diseases* **25**, 101-105.

RIGOS, G., TYPERNOU, A.E., NENGAS, I., YIAGNISIS, M., KOUTSODIMOU, M., ALEXIS, M. & TROISI, G.M. (2003). Pharmacokinetics flumequine and *in vitro* activity against bacterial pathogens of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms* **54**, 35-41.

RIGOS, G & TROISI, G.M. (2005). Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **15**, 53-73.

ROBINSON, A.A., BELDEN, J.B. & LYDY, M.J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental toxicology and Chemistry* **24**(2), 423-430.

ROBINSON, J.A., VENEZIO, F.R., CONSTANZO-NORDIN, M.R., PIFARRE, R. & O'KEEFE, P.J. (1990). Patients receiving quinolones and cyclosporine after heart transplantation. *The Journal of Heart Transplantation* **9**(1), 30-31.

ROCHE, S., GOUGEROT-POCIDALO, FAY, M., ETIENNE, D., FOREST, N. & POCIDALO, J.J. (1987). Comparative effects of quinolones on human mononuclear leucocyte functions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **19**(6), 781-790.

RODGERS, C.J. & AUSTIN, B. (1983). Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. *Veterinary Record* **112**, 83.

ROGGE, M.C., SOLOMON, W.R., SEDMAN, A.J., WELLING, P.G., TOOTHAKER, R.D. & WAGNER, J.G. (1988). The theophylline-enoxacin interaction: 1. Effects of enoxacin dose size on theophylline disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **44**(5), 579-587.

ROGSTAD, A., ELLINGSEN, O.F. & SYVERTSEN, C. (1993). Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater. *Aquaculture* **110**, 207-220.

ROHLFING, S.R., GERSTER, J.F. & KVAM, D.C. (1977). Bioevaluation of the antibacterial flumequine for enteric use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **3**(6), 615-620.

- ROLINSKI, Z., KOWALSKI, C., ZAN, R. & SOBOL, M. (2002). Bacterial resistance to quinolone antibiotics in Poland. *Journal of Veterinary Medicine* **49**(3), 160-162.
- ROSE, M.D., BYGRAVE, J. & STUBBINGS, G.W. (1998). Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. *Analyst* **123**(12), 2789-2796.
- ROSEMBOOM, H., SOREL, R.H.A., LINGEMAN, H. & BOUWAN, R. (1979). Rapid gas chromatographic method for the determination of nalidixic acid in plasma. *Journal of Chromatography* **163**(1), 92-95.
- ROYBAL, J.E., PFENNING, A.P., TURNIPSEED, S.B., WALKER, C.C. & HURLUT, H.A. (1997). Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International (JAOAC)* **80**(5), 982-987.
- ROYER-MORROT, M.J., GÉRARD, A., ZHIRI, A., SCHOONEMAN, F., DUREUX, J.B., & ROYER R.J. (1991). Effects of plasma exchange on flumequine pharmacokinetics: comparison with control kinetics. *Therapeutic Drug Monitoring* **13**(4), 296-303.
- RUBINSTEIN, E. (2001). History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* **47**(Suppl. 3), 3-8.
- RUBINSTEIN, E. & SEGEV, S. (1987). Drugs interaction of ciprofloxacin with other non-antibiotics agents. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 119-123.
- RUIZ-GARCIA, A., BERMEJO, M., MERINO, V., SÁNCHEZ-CASTAÑO, G. FREIXAS, J. & GARRIGUES, T.M. (1999). Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **48**(3), 253-258.
- SABADA, B., ESCOLAR, M., AZANZA, J.R. & GARCÍA, Q. (1998). Quinolonas. *Medicine* **7**(72), 3344-3353.
- SAMAHA, I., ELLERBROEK, L., EBRECHT, A., MATTHES, S. & WENZEL, S. (1991). Pharmacokinetics and tissue residues of flumequine in chickens. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **42**(2), 33-36.
- SAMUELSEN, O.B. (2006). Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. *Aquaculture* **255**, 55-75.
- SAMUELSEN, O.B. & BERGH, O. (2004). Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid in the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua* L.) *Aquaculture* **235**, 27-35.
- SAMUELSEN, O.B. & ERVIK, A. (1997). Single dose pharmacokinetic study of flumequine after intravenous, intraperitoneal and oral administration to Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) held in seawater at 9°C. *Aquaculture* **158**, 215-227.

SAMUELSEN, O.B. & ERVIK, A. (2001). Absorption, tissue distribution and excretion of flumequine and oxolinic acid in corwing wrasse (*Symphodus melops*) following a single intraperitoneal injection or bath treatment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **24**, 111-116.

SAMUELSEN, O.B. & LUNESTAD, B.T. (1996). Bath treatment, an alternative method for the administration of the quinolones flumequine and oxolinic acid to halibut *Hippoglossus* and in vitro antibacterial activity of the drugs against some *Vibrio* sp. *Disease Aquatic Organisms* **27**, 13-18.

SAMUELSEN, O.B., LUNESTAD, B.T., ERVIK, A., & FJELDE, S. (1994). Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* **126**(3-4), 283-290.

SANDERS, P., ARNAUD, G., MANCO, B. & GUYONET, J. (1997). Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of flumequine for treatment of *E. Coli* in poultry. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Spain*. P18, In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(Suppl. 1), 149-150.

SARKAR, M., POLK, R.E., GUZELIAN, P.S., HUNT, C. & KARNES, H.T. (1990). *In vitro* effect of fluoroquinolones on theophylline metabolism in human liver microsomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**(4), 594-599.

SATO, K., HOSHINO, K. & MITSUHASHI, S. (1992). Mode of action of new quinolones: the inhibitory activity on DNA gyrase. *Progress in Drug Research* **38**, 121-132.

SCHEER, M. (1987). Studies on the antibacterial activity of baytril. *Veterinary Medical Review* **2**, 104-118.

SCHENTAG, J.J. (1989). Clinical significance of antibiotic tissue penetration. *Clinical Pharmacokinetics* **16**(Suppl. 1), 25-31.

SCHENTAG, J.J. (1991). Correlation of pharmacokinetic parameters to efficacy of antibiotics: relationship between serum concentrations, MIC values, and bacterial eradication in patients with gram-negative pneumonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **74**(S1), 218-234.

SCHENTAG, J.J., SWANSON, D.J. & SMITH, I.L. (1985). Dual individualization: antibiotic dosage calculation from the integration of in-vitro pharmacodynamics and in-vivo pharmacokinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **15**(Suppl. A), 47-57.

SCHLUTER, G. (1987). Ciprofloxacin: review of potential toxicologic effects. *The American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 91-93.

SCHOLL, H., SCHMIDT, K. & WEBER, B. (1987). Sensitive and selective determination of picogram amounts of ciprofloxacin and its metabolites in biological samples using high performance liquid chromatography and photothermal post-column derivatisation. *Journal of Chromatography* **416**(2), 321-330.

- SCHUPPAN, D., HARRISON, L.I., ROHLFING, S.R., MILLER, H.L., FUNK, M.L., HANSEN, C.S. & OBER, R.E. (1985). Plasma and urine levels of flumequine and 7-hydroxyflumequine following single and multiple oral dosing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **15**(3), 337-343.
- SCHWARTZ, J., JAUREGUI, L., LETTIERI, J. & BACHMANN, K. (1988). Impact of ciprofloxacin on theophylline clearance and steady-state concentrations in serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 75-77.
- SHAH, P.M. & MULERT, R. (1990). Safety profile of quinolones. *European Urology* **17**(Suppl. 1), 46-51.
- SHAKIBAEI, M., DE SOUZA, P., SICKLE, D.V. & STAHLMANN, R. (2001). Biochemical changes in achilles tendon from juvenile dogs after treatment with ciprofloxacin or feeding a magnesium-deficient diet. *Archives of Toxicology* **75**(6), 369-374.
- SHARGEL, L & YU, A.B.C. (1993). *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. Third Edition. New York. Prentice Hall International Editions, pp. 77-110.
- SHARMA, A.K., KHOSLA, R., KELAAND, A.K. & MEHTA, V.L. (1994). Fluoroquinolones: Antimicrobial agents of the 90's. *Indian Journal of Pharmacology* **26**, 249-261.
- SHEM-TOV, M., ZIV, G. GLICMAN, A & SARAN, A.(1997). Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from blood in to the milk of cows and ewes. *Journal of Veterinary Medicine A* **44**(9-10), 511-519.
- SHIMODA, K. & KATO, M. (1998). Involvement of reactive oxygen species, protein kinase C, and tyrosine kinase in prostaglandin E<sub>2</sub> production in Balb/c 3T3 mouse fibroblast cells by quinolone phototoxicity. *Archives of Toxicology* **72**(5), 251-256.
- SHOJAEE, A. & LEES, P. (1997). Pharmacodynamic and pharmacokinetic inter-relationships of antibacterial drugs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(S1), 14-17.
- SMITH, J.T. (1986a). The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **18**(Suppl. D), 21-29.
- SMITH, J.T. (1986b). Frequency and expression of mutational resistance to the 4-quinolone antibacterial. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **49**(Suppl.), 115-123.
- SMITH, P., HINEY, M.P. & SAMUELSEN, O.B. (1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases* **4**, 273-313.
- SMYTHE, M.A. & RYBAK, M.J. (1989). Ofloxacin: A review. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy/The Annals of Pharmacotherapy* **23**(11), 839-846.

SOHLBERG, S., CZERWINSKE, K., RASMUSSEN, K. & SOLI, N.E. (1990). Plasma concentrations of flumequine after intra-arterial and oral administration to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to low water temperatures. *Aquaculture* **84**, 335-361.

SOHLBERG, S., AULIE, A. & SOLI, N.E. (1994). Temperature-dependent absorption and elimination of flumequine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in fresh water. *Aquaculture* **119**, 1-10.

SOHLBERG, S., MARTINSEN, B., HORSBERG, T.E. & SOLI, N.E. (1999). Excretion of flumequine in free-swimming Atlantic salmon (*Salmo salar*), determined by cannulation of dorsal aorta, gall bladder and urethra. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**, 72-75.

SOHLBERG, S., INGEBRIGTSEN, K., HANSEN, M.K., HYATON, W.L. & HORSBERG, E. (2002). Flumequine in Atlantic salmon *Salmo salar*: disposition in fish held in sea water versus fresh water. *Diseases of Aquatic Organisms* **49**(1), 39-44.

SÖREL, R.H.A. & ROSEMBOOM, H. (1979). High-performance liquid chromatographic analysis of nalidixic acid in plasma after alkylation with methyl iodide. *Journal of Chromatography* **162**(3), 461-465.

SÖRGEL, F. (1989). Metabolism of gyrase inhibitors. *Reviews of Infectious Diseases* **11**(Suppl. 5), S1119-1121.

SÖRGEL, F. & KINZIG, M. (1993a). Pharmacokinetics of gyrase inhibitors, part 1: Basic chemistry and gastrointestinal disposition. *American Journal of Medicine* **94**(Suppl. 3A), 44-55.

SÖRGEL, F. & KINZIG, M. (1993b). Pharmacokinetics of gyrase inhibitors, part 2: Renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *American Journal of Medicine* **94**(Suppl. 3A), 56-69.

SÖRGEL, F., JAEHDE, U., NABER, K. & STEPHAN, U. (1989). Pharmacokinetic disposition of fluoroquinolones in human body fluids and tissues. *Clinical Pharmacokinetics*, **16**(Suppl. 1), 5-24.

SØRUM, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup, F.M. (Ed.), American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, pp. 213-238.

SPRENG, M., DELAFORGE, J., THOMAS, V., BOISRAME, B. & DRUGEON, H. (1995). Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**(4), 284-289.

STAHLMANN, R. (2002). Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicology Letters* **127**(1-3), 269-277.

- STAHLMANN, R. & LODE, H. (1998). Safety overview. Toxicity, adverse effects, and drug interactions. In: Andriole VT, ed. *The Quinolones*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, pp. 369-415.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (1999). Toxicity of quinolones. *Drugs* **58**(Suppl. 2), 37-42.
- STAHLMANN, R., KÜHNER, S., SHAKIBAEI, M., FLORES, J., VORMANN, J. & VAN SICKLE, D.C. (2000a). Effects of magnesium deficiency on joint cartilage in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy, and mineral concentrations. *Archives of Toxicology* **73**(10-11), 573-580.
- STAHLMANN, R., KÜHNER, S., SHAKIBAEI, M., SCHWABE, R., FLORES, J., EVANDER, S.A. & VAN SICKLE, D.C. (2000b). Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Archives of Toxicology* **73**(10-11), 564-572.
- STAIB, A.H., HARDER, S., FABER, WACK, C. & MEDERT, G. (1989). Interaction of 4-quinolones with theophylline metabolism in men: Investigations with lomefloxacin and pipemidic acid. *29<sup>th</sup> Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Sept. 17-20, Houston, Texas), abs. 218.
- STEFFENAK, I., HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. (1991). Reservoir of quinolone residues in fish. *Food Additives and Contaminants* **8**, 777-780.
- STEIN, G.E. (1991). Drugs interaction with fluoroquinolones. *The American Journal of Medicine* **91**(Suppl. 6A), 81-86.
- STRELEVITZ, T.J. & LINHARES, M.C. (1996). Simultaneous determination of danofloxacin and N-desmethyldanofloxacin in cattle and chicken edible tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography-B, Biomedical Sciences and Applications* **675**, 243-250.
- SUH, B. & LORBER, B. (1995). Quinolones. *Medical Clinics of North America* **79**(4), 869-894.
- SUMANO, L.H., OCAMPO, C.L., BRUMBAUGH, G.W. & LIZARRAGA, R.E. (1998). Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. *British Poultry Science* **39**(1), 42-46.
- TABA, H. & KUSANO, N. (1998). Sparfloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Involvement of multiple mutations in *gyrA* and *parC* genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(9), 2193-2196.
- TAKASUNA, K., KASAI, Y., USUI, C., TAKAHASHI, M., HIROHASHI, M., TAKAMURA, K. & TAKAYAMA, S. (1992). General pharmacology of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arzneimittel-Forschung-Forsch/Drug Research* **42**(1), 408-418.

- TAKAYAMA, S., HIROHASHI, M., KATO, M. & SHIMADA, H. (1995). Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **45**(1), 1-45.
- TAKEI, M., FUKUDA, H., KISHI, R. & HOSAKA, M. (2001). Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(12), 3544-3547.
- TALÉNS-VISCONTI, R., GARRIGUES, T.M. & CANTÓN E. (2002). Mechanisms of bacterial resistance to quinolones. *Revista Española de Quimioterapia* **15**(1), 25-31.
- TANAKA, M., ONODERA, Y., UCHIDA, Y., SATO, K. & HAYAKAWA, I. (1997). Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV purified from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(11), 2362-2366.
- THIEL, R., METZNER, S., GERICKE, C., RAHM, U. & STAHLMANN, R. (2001). Effects of fluoroquinolones on the locomotor activity in rats. *Archives of Toxicology* **75**(1), 36-41.
- THOMSON, D.J., MENKIS, A.H. & MCKENZIE, F.N. (1989). Norfloxacin-cyclosporine interaction. *Transplantation* **46**, 312-313.
- THOMSON, K.S., SANDERS, C.C. & HAYDEN, M.E. (1991). In vitro studies with five quinolones: Evidence for changes in relative potency as quinolone resistance rises. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**(11), 2329-2334.
- TOON, S., HOPKINS, K.J., GARSTANG, F.M., AARONS, L., SEDMAN, A. & ROWLAND, M. (1987). Enoxacin-warfarin interaction: pharmacokinetic and stereochemical aspects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **42**(1), 33-41.
- TORANZO, A.E., MAGARIÑOS, B. & ROMALDE, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**, 37-61.
- TOURAKI, M., NIOPAS, I., LADOUKAKIS, E. & KARAGIANNIS, V. (2010). Efficacy of flumequine administered by bath or through medicated nauplii of *Artemia franciscana* (L) in the treatment of vibriosis in sea bass larvae. *Aquaculture* **306**, 146-152.
- TOUTAIN, P.L., DEL CASTILLO, J.R. & BOUSQUET-MELOU, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science* **73**, 105-114.
- TSUJI, A., SATO, H., KUME, Y., TAMAI, I., OKESAKI, E., NAGATA, O. & KATO, H. (1988). Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**(2), 190-194.

TYRPENOU, A.E., KOTZAMANIS, Y.P. & ALEXIS, M.N. (2003). Flumequine depletion from muscle plus skin tissue of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed flumequine medicated feed in seawater at 18 and 24 °C. *Aquaculture* **220**, 633-642.

UPTON, R.A. (1991). Pharmacokinetics interactions between theophylline and other medication (Part. 1). *Clinical Pharmacokinetics* **20**(1), 66-80.

VAN DER HEIJDEN, M.H.T., HEUKENS, H.J., VAN DEN NIEUWBOER, W.H.F.X., MENGELERS, M.J.B. & BOON, J.H. (1994). Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) after a single peroral administration. *Aquaculture* **123**, 21-30.

VAN DER HEIJDEN, M.H.T., BOOMS, G.H.R., TANCK, M.W.T., ROMBOUT, J.H.W.M. & BOOM J.H. (1995a). Influence of flumequine on *in vivo* mitogen responses of European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) lymphoid cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **47**(1-2), 143-152.

VAN DER HEIJDEN, M.H.T., ROOIJAKKERS, J.B.M.A., BOOMS, G.H.R., ROMBOUT, J.H.W.M. & BOOM J.H. (1995b). Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **45**(1-2), 151-164.

VAN DER HEIJDEN, M.H.T., HELDERS, G.M., BOOMS, G.H.R., HUISMAN, E.A., ROMBOUT, J.H.W.M. & BOOM J.H. (1996). Influence of flumequine and oxytetracycline on the resistance of the European eel against the parasitic swimbladder nematode *Anguillicola crassus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **52**(1), 127-134.

VANCUTSEM, P.M., BABISH, J.G. & SCHWARK, W.S. (1990). The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian* **80**(2), 173-186.

VERGIN, H. & METZ, R. (1991). Reviews of developments in fluoroquinolones. *Drugs Today* **27**(3), 177-192.

VIK-MO, F.T., BERG, O. & SAMUELSEN, O.B. (2005). Efficacy of orally administered flumequine in the treatment of vibriosis caused by *Listonella anguillarum* in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of Aquatic Organisms* **67**, 87-92.

VILLA, R., CAGNARDI, P., ACOCELLA, F., MASSI, P., ANFOSSI, P., ASTA, F. & CARLI, S. (2005). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. *The Veterinary Journal* **170**, 101-107.

VOIGT, W.H. (1992). Electron microscopic studies on the effect of quinolone carboxylic acid derivative on the structural of Coli and Staphylococcal bacteria *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 119-121.

- VREE, T.B., VAN EWIIK-BENEKEN KOLMER, E.W.J., & NOUWS, J.F.M. (1992). Direct-gradient high-performance liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of flumequine and flumequine acyl glucuronide in humans: effects of probenecid. *Journal of Chromatography* **579**(1), 131-141.
- WAGNER, J.G. (1975). Fundamentals of clinical Pharmacokinetics. 1<sup>st</sup> edition. Drug Intelligence Publications. Hamilton, Illinois.
- WAGNER, J.G.(1976). Linear pharmacokinetics equations allowing direct calculation of many needed pharmacokinetic parameters from the coefficients and exponents of polyexponential equations which have been fitted to the data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmacy* **4**(5), 443-467.
- WALKER, R.D. (2000). The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal* **78**(2), 84-90.
- WALKER, R.D., STEIN, G.E., HAUPTMAN, J.G. & MACDONALD, K.H.. (1989). Serum and tissue fluid norfloxacin concentrations after oral administration of the drug to healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research* **50**(1), 154-157.
- WALKER, R.D., STEIN, G.E., HAUPTMAN, J.G. & MACDONALD, K.H.. (1992). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research* **53**, 2315-2319.
- WARREN, A., TOWNSEND, K.M., KING, T., MOSS, S., O'BOYLE, D., YATES, R.M. & TROTT, D.J. (2001). Multi-drug resistant *Escherichia coli* with extended spectrum  $\beta$ -lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. *Australian Veterinary Journal* **79**(9), 621-623.
- WATTS, J. L., SALOMON, S. A., SANCHEZ, M.S. & YANCET, R. J. (1997). *In vitro* activity of premafloxacin, a new extended-spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(5), 1190-1192.
- WHO/FAO/OIE. (2007). Report of a joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance, Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006. World Health Organization, Geneva, p.97.
- WIEDEMANN, B. & HEISIG, P. (1994). Mechanism of quinolone resistance. *Infection* **22**(Suppl. 2), s73-s79.
- WIGENDER, W., GRAEFE, K.H., GAU, W., FÖRSTER, D., BEERMANN, D. & SCHATCHT, P. (1984). Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and intravenous administration in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Microbiology* **3**(4), 355-359.
- WIJNANDS, W.J.A., VREE, T.B. & VAN HERWAARDEN, C.L.A. (1985). Enoxacin decreases the clearance of theophylline in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* **20**(6), 583-588.

- WIJNANDS, W.J.A., VREE, T.B. & VAN HERWAARDEN, C.L.A. (1986). The influence of quinolone derivatives on theophylline clearance. *British Journal of Clinical Pharmacology* **22**(6), 277-283.
- WISE, R. (1991). Comparative penetration of selected quinolones into respiratory tract fluids and tissues. *American Journal of Medicine* **91**(Suppl. A), S67-S70.
- WISE, R. & DONOVAN, I.A. (1987). Tissue penetration and metabolism of ciprofloxacin. *American Journal of Medicine* **82**(Suppl. 4A), 103-107.
- WISE, R., BALWIND, D.R., ANDREWS, J.M. & HONEYBOURNE, D. (1991). Comparative pharmacokinetic disposition of fluoroquinolones in the lung. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **28**(Suppl. C), 65-72.
- WISE, R., LISTER, D., McNULLY, C.A.M., GRIGGS, D. & ANDREWS, J.M. (1986). The comparative pharmacokinetics of five quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **18**(Suppl. D), 71-81.
- WOLFSON, J.S. & HOOPER, D.C. (1989a). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **2**(4), 378-424.
- WOLFSON, J.S. & HOOPER, D.C. (1989b). Treatment of genitourinary tract infections with fluoroquinolones: activity in vitro, pharmacokinetics, and clinical efficacy in urinary tract infections and prostatitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**(10), 1655-1661.
- WOLFSON, J.S. & HOOPER, D.C. (1991a). Overview of fluoroquinolone safety. *The American Journal of Medicine* **91**(S6), 153-161.
- WOLFSON, J.S. & HOOPER, D.C. (1991b). Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects. *European Journal of Clinical Infectious Diseases* **10**(4), 267-274.
- WU, H-L., HSU, L-C. & HSU, C-Y. (1980). Gas chromatographic determination of piromidic acid. *Journal of Chromatography* **193**, 476-479.
- YAMAMOTO, K, YOSHIMURA, K. & MATSUSHITA, A. (1980). General pharmacology of cinoxacin on the central nervous system. *Chemotherapy* **28**(S-4), 530-549.
- YAMAMOTO, K., NAITOH, Y., INOUE, Y. & YOSHIMURA, K. (1988). Seizure discharges induced by the combination of a new quinolone carboxylic acid antimicrobial drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs-effects of NY-198 on the central nervous system. *Chemotherapy* **28**(S-2), 300-324.
- YAMAOKA, K., YAKAGAWA, T. & UNO, T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion(AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equation. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **6**(2), 165-175.

YONEZAWA, M., TAKAHATA, M., MATSUBARA, N., WATANABE, Y. & NARITA, H. (1995). DNA-gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(9), 1970-1972.

YORKE, J.C. & FROC, P. (2000). Quantification of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **882**(1-2), 63-77.

YOSHIDA, M., MIYAJIMA, K., SHIRAKI, K., ANDO, J., KUDOH, K., NAKAE, D., TAKAHASHI, M. & MAEKAWA, A. (1999). Hepatotoxicity and consequently increased cell proliferation are associated with flumequine hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Letters* **141**(1-2), 99-107.

ZHANEL, G.G. (2001). Influence of pharmacokinetic and pharmacodynamic principles on antibiotic selection. *Current Infectious Disease* **3**, 29-34.

ZINNER, S. H. (1989). Clinical overview of enoxacin. *Clinical Pharmacokinetics* **16**(Suppl. 1), 59-64.

ZIV, G. (1994). Pharmacotherapeutics of antibacterial fluoroquinolones in small and large animal practice. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Edinburgh, pp. 194-196.

ZIV, G., SOBACK, S., BOR, A. & KURTZ, B. (1986). Clinical pharmacokinetics of flumequine in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **9**(2), 171-182.

ZLOTOS, G., BUCKER, A., KNZING-SCHIPPERS, M., SORGEL, F. & HOLZGRABE, U. (1998). Plasma protein binding of gyrase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Science* **87**(82), 215-220.

## 7. ANEXO

### ABSTRACT

**Introduction.** Quinolones are often used in pet animals, livestock and fish farming industries in cases of pulmonary, urinary and digestive infections as they act by inhibiting bacterial DNAgyrase. Flumequine (9-fluoruro-6,7-dihydro-5-methyl-1-oxo-1H,5H-benzo-quinolizine-2-carboxylic acid) is a member of the halogenated quinoline carboxylic acid group of antibacterial agents with antimicrobial activity against a wide range of Gram-negative bacteria (NEUMAN, 1978; ANADON and MARTINEZ-LARRAÑAGA., 1992). Flumequine is particularly active against *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Pasteurella* spp. and is commonly used in food producing species (ruminants, pigs, birds, fish) (DORRESTEIN *et al.*, 1983; ZIV *et al.*, 1986; DELMAS *et al.*, 1997; SAMUELSEN, 1997; HANSEN and HORSBERG, 1999). The minimal inhibitory concentrations (MIC) of flumequine for these bacteria are reported in the range 0.01–1 µg/ml (DORRESTEIN *et al.*, 1983; ZIV *et al.*, 1986; MEVIUS *et al.*, 1990b). Studies on the kinetic behavior of flumequine in rats, dogs, calves, sheep, goats, pigs and poultry are available (ZIV *et al.*, 1986; MEVIUS *et al.*, 1990a; DELMAS *et al.*, 1997; RUIZ-GARCIA *et al.*, 1999; HARRISON *et al.*, 1986; MEIJER *et al.*, 1994; VILLA *et al.*, 2005; ROGSTAD *et al.*, 1993; ANADON *et al.*, 2008). However, limited information is available on disposition and safety of flumequine in fish. These studies were performed mainly in the Atlantic salmon reared in sea water, in halibut and tarbot (HANSEN and HORSBERG, 1999; ROGSTAD *et al.*, 1993). Because the therapeutic use of flumequine in farmed marine fish is consolidated, in particular in the specie sea bream (*Sparus aurata*), further studies on flumequine disposition in this particular fish

species are needed. Because the major pharmacodynamic effect of flumequine is its antimicrobial activity, from a clinical point of view, flumequine should be assayed in the plasma to compare these plasma concentrations with the MIC values of potential pathogens. On the other hand, there is a strict legislative framework controlling the use of quinolone substances, with the aim of minimizing the risk to human health associated with consumption of their residues. Therefore, to ensure human food safety, the European Union (EU) has set tolerance levels for these compounds as maximum residue limits (LMR). The LMR in fish was fixed for flumequine at 600 µg/kg in muscle + skin (EMEA, 1999, 2008). Depletion of drugs from food producing animals must be assessed in order to determine the time needed before the antibiotic disappears from animal tissue and to assess in a definitive way when the treated animal can be safely consumed (ANADON *et al.*, 1999). In this framework, there is a demand for suitable and sensitive analytical methods that can be used to monitor the levels of quinolone residues in foods and to establish drug withdrawal times in fish after pharmacological treatments (ANADON *et al.*, 2012).

**The objectives of the present study were:** (i) to describe the kinetic behavior of flumequine following single and multiple oral dose in sea bream (*Sparus aurata*), and (ii) to evaluate the depletion of flumequine in edible tissues (muscle + skin) after multiple oral dose.

**Material and Methods.** The medicated feed for the oral administration was made by homogeneously mixing 1.2 g flumequine with 1000 g of fish feed. Approximately 250 sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), varying in weight from 200 to 210 g were randomly divided into two main groups (Group 1 with 180 fish, and Group 2 with 49 fish). The seawater had a salinity of 37<sup>0</sup>/<sub>00</sub> and a temperature of 18°C.

Group 1 (180 fish) and Group 2 (49 fish) received flumequine orally at a nominal dose rate of 12 mg/kg bw every 24 h over five days. Following anesthetization with 2-phenoxy-ethanol of fish of Group 1, blood samples were collected from caudal vein using a heparinized syringe at different time periods (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h and 24 h post-administration after first and fifth dose. Plasma was isolated by centrifugation of the blood. Plasma samples were immediately frozen and stored at -45°C until assayed for concentrations of flumequine. Fish of Group 2 were euthanized by exposing them to freezing cold water at 0.125 (n=7), 1 (n=7), 2 (n=7), 3 (n=7), 8 (n=7), 10 (n=7) and 14 (n=7) days after the last dose of flumequine. Fish were immediately exsanguinated and tissue specimens (2 g) of muscle + skin were collected separately. Each of the tissue specimens was carefully weighed and stored frozen at -45°C until assayed for concentrations of flumequine. Plasma and tissue concentrations of flumequine were measured using a HPLC technique (YORKE and FROC, 2000) with modifications.

An HPLC system (LC-10AS Shimadzu) equipped with a spectrofluorimetric detector (RF-551 Shimadzu) and a data processor (C-R6A chromatopac Shimadzu) was used to measure the amount of flumequine in plasma and tissues. Operating conditions for the HPLC analyses were: a polymeric column, PLRP-S, 5 µm, 150 x 4.6 mm I.D., packed by Polymer Laboratories obtained from Scharlau SL. The mobile phase was HPLC water containing H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, acetonitrile and tetrahydrofuran (72:16:12, v/v/v). Flow rate was 1.0 ml/min. Excitation and emission wavelengths of the detector were 312 and 366 nm, respectively. The system worked at room temperature. The analytical method was validated for recovery rate, linearity, specificity, accuracy and precision as indicated in the recommendations for analytical methods for veterinary drug residues in tissues (EMEA, 1998). Drug concentrations were determined from

peak areas and the use of calibration curves obtained by running plasma and tissue samples from fish not administered flumequine that were spiked with known concentrations of flumequine. For plasma and tissue specimens, the calibration curves were linear and reproducible for concentrations ranging from 0.001 to 20.00 µg/ml (or 0.001–20.00 µg/g tissue) for flumequine. The limit of quantification was 0.001 µg/ml for plasma or 0.001 µg/g for tissue. Mean analytical recovery exceeded 90% in the plasma and tissue for flumequine. Within-day and between-day assay coefficients of variation were <5.5%.

Standard pharmacokinetic parameters were calculated from the relationship between mean plasma concentration versus time using the computer program WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

**Results and Discussion.** Flumequine plasma disposition curves after repeated oral administration (12 mg/kg b.w., daily for 5 days) were best described by a two-compartmental open model. Oral absorption was rapid, as reflected by the half-life for this process which was 1,542 h and the time for the maximum plasma concentration ( $T_{max}$ ) of 2,573 h. The maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) was 0.621 µg/ml. The elimination half-life following oral administration was 18,396 h. Flumequine plasma concentrations decreased slowly and plasma antimicrobial levels in a range 0,094 to 0,123 µg/ml were detectable up to 12 h post-administration. Residues of flumequine in tissue specimens after oral administration of flumequine (12 mg/kg b.w. daily for 5 consecutive days) were determined. Mean tissue concentrations of flumequine of 1564.98 µg/kg were measured 3 h after administration of the last dose of flumequine. The flumequine concentrations depleted rapidly from the muscle + skin tissue. Marker residue concentrations (flumequine) were below the MRL value in all samples one day

after the end of treatment. Numerous experimental designs and statistical approach are used to establish the withdrawal time. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products recommends use of a linear regression technique as the method of choice (EMA, 2002). Using this approach, the withdrawal time for flumequine calculated for muscle + skin tissue after oral administration (12 mg/kg b.w., daily for 5 consecutive days) was 2 days.

**In summary**, this study shows the pharmacokinetic properties and tissue depletion of flumequine in sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758). Our study provides data for a more prudent use of flumequine in sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), suggesting a possible rational dosing and a withdrawal time after treatment in order to guarantee safety in foods for the consumers.

## References

ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1992). Pharmacology and Toxicology of Quinolones. In: *Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. Sunshine, I. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, pp 193-198.

ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* **59**, 183-198.

ANADÓN, A., MARTINEZ, M.A., MARTINEZ, M., DE LA CRUZ, C., DIAZ, M.J. & MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2008). Oral bioavailability, tissue distribution and depletion of flumequine in the food producing animal, chicken for fattening. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 662–670.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & CASTELLANO, V. (2012). Regulatory aspects for the drugs and chemical used in food-producing animals in the European Union. In: *Veterinary Toxicology*. Gupta, R.C. (Eds). Oxford, pp. 135-155. Oxford Academic Press.

DELMAS, J.M., CHAPEL, A.M., GAUDIN, V. & SANDERS, P. (1997). Pharmacokinetics of flumequine in sheep after intravenous and intramuscular administration: bioavailability and tissue residue studies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(4), 249-257.

DORRESTEIN, G.M., VAN GOGH, H., BUITELAAR, M.N. & NOUWS, J.F.M. (1983). Clinical pharmacokinetics of flumequine after intravenous, intramuscular and oral administration in pigeons (*Columba livia*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **6**(4), 281-292.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1998). Guideline on validation of analytical procedures: Methodology, EMA/VICH/591/98 FINAL. December 1998, London, UK.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1999). Flumequine. Summary report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products EMA/MRL/624/99-FINAL, July 1999, London, UK.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (2002). Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods- Update application software. EMA/CVMP/563/02-FINAL, May 2002, London, UK.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (2008). Guideline on demonstration of target animal safety and efficacy of veterinary medicinal products intended for use in farmed finfish. EMA/CVMP/EWP/459868/2008-CONSULTATION, October 2009, London, UK.

HANSEN, M.K. & HORSBERG, T.E. (1999). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**, 122-126.

HARRISON, L.I., SCHUPPAN, D., ROHFLING, S.R., HANSEN, A.R., GESTER, J.F., HANSEN, C.S., FUNK, M.L. & OBER, R.E. (1986). Disposition of radiolabeled flumequine in rat and dog. *Drug Metabolism and Disposition* **14**(5), 555-558.

MEIJER, B.A., CEYSSSENS, K.G.F., DE JONG, W.TH. & DE GRÈVE, B.I.A.C. (1994). Bioavailability of flumequine after semisimultaneous administration to veal calves. *Pharmaceutical Research* **11**(1), 117-121.

MEVIUS, D.J., BREUKINK, P., GUELEN, P.J.M., JANSEN, T. & DE GRÈVE, B. (1990a). Pharmacokinetics, metabolism and renal clearance of flumequine in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **13**(2), 159-169.

MEVIUS, D.J., BREUKINK, P. & VAN MIERT, A.S.J.P.A. (1990b). *In vitro* activity of flumequine in comparison with several pathogens isolated in calves in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* **12**(4), 212-220.

NEUMAN, M. (1978). Flumequine. *Drugs Today* **14**, 365-566.

ROGSTAD, A., ELLINGSEN, O.F. & SYVERTSEN, C. (1993). Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater. *Aquaculture* **110**, 207-220.

RUIZ-GARCIA, A., BERMEJO, M., MERINO, V., SÁNCHEZ-CASTAÑO, G. FREIXAS, J. & GARRIGUES, T.M. (1999). Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **48**(3), 253-258.

SAMUELSEN, O.B. & ERVIK, A. (1997). Single dose pharmacokinetic study of flumequine after intravenous, intraperitoneal and oral administration to Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) held in seawater at 9°C. *Aquaculture* **158**, 215-227.

VILLA, R., CAGNARDI, P., ACOCELLA, F., MASSI, P., ANFOSSI, P., ASTA, F. & CARLI, S. (2005). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. *The Veterinary Journal* **170**, 101-107.

YORKE, J.C. & FROC, P. (2000). Quantification of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **882**(1-2), 63-77.

ZIV, G., SOBACK, S., BOR, A. & KURTZ, B. (1986). Clinical pharmacokinetics of flumequine in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **9**(2), 171-182.