

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Farmacocinética de oxitetraciclina en dosificación oral múltiple en cerdos. Análisis PK-PD

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alonso Dupuy Mateos

Directores

**Arturo Anadón Navarro
María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



FARMACOCINÉTICA DE
OXITETRACICLINA
EN DOSIFICACIÓN ORAL MÚLTIPLE EN
CERDOS. ANÁLISIS PK-PD.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ALONSO DUPUY MATEOS

Bajo la dirección de los Profesores Doctores

Arturo Anadón Navarro

María Aránzazu Martínez Caballero

Irma Ares Lombán

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



**FARMACOCINÉTICA DE OXITETRACICLINA
EN DOSIFICACIÓN ORAL MÚLTIPLE EN
CERDOS. ANÁLISIS PK-PD.**

**TESIS DOCTORAL
ALONSO DUPUY MATEOS**

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

**FARMACOCINÉTICA DE OXITETRACICLINA
EN DOSIFICACIÓN ORAL MÚLTIPLE EN
CERDOS. ANÁLISIS PK-PD.**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Toxicología y Farmacología**

ALONSO DUPUY MATEOS

Madrid, 2015

ALONSO DUPUY MATEOS

**FARMACOCINÉTICA DE OXITETRACICLINA
EN DOSIFICACIÓN ORAL MÚLTIPLE EN
CERDOS. ANÁLISIS PK-PD.**

Directores:

**Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro
Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria
Facultad de Veterinaria**

**Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero
Profesora Titular de Toxicología
Facultad de Veterinaria**

**Prof. Dra. Irma Ares Lombán
Profesora Contratado Doctor de Toxicología
Facultad de Veterinaria**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Trabajo financiado por el Proyecto Ref. UCM-BSGH/GR3/14 *Universidad Complutense de Madrid*, por el Proyecto (ALIBIRD-CM Programa) Ref. S2013/ABI-2728 de la *Comunidad de Madrid*.

Deseo expresar mi agradecimiento:

A mis Directores de Tesis Doctoral, el Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, la Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología y la Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Contratado Doctor de Toxicología por la dirección de esta Memoria, por todas sus enseñanzas, confianza y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Prof. Dra. María Rosa Martínez-Larrañaga, Catedrática de Toxicología, que de forma tan generosa ha contribuido con su permanente apoyo y estímulo a que esta Tesis Doctoral pueda ser presentada.

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.

A toda mi familia, muy especialmente a mis hijos, Alonso, Celia y James; a mi padre por su apoyo constante y sobre todo en estos años difíciles; a mi madre por su continuo cariño, amor y apoyo incondicional; a mis hermanas Paloma y Ana; a mi sobrina y ahijada Claudia; y a Jasmina por su cariño, comprensión y amor.

A todos los seres queridos que por uno u otro motivo ya no puedan recibir mi agradecimiento; pero que han permitido en algún momento, con su apoyo, a la consecución de esta tesis.



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 Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

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

CERTIFICAN que D. ALONSO DUPUY MATEOS

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada **“Farmacocinética de Oxitetraciclina en Dosificación Oral Múltiple en Cerdos. Análisis PK-PD”** 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 16 de octubre de dos mil quince.

Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero

Prof. Dra. Irma Ares Lombán

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Origen y aspectos generales de la oxitetraciclina	6
2.1.1. Historia de la oxitetraciclina.....	6
2.1.2. Estructura química de la Oxitetraciclina y propiedades fisicoquímicas.....	9
2.1.3. Relación estructura-actividad de la oxitetraciclina.....	11
2.2. Acción farmacológica.....	15
2.2.1. Mecanismo de acción	15
2.2.2. Espectro antimicrobiano.....	16
2.2.3. Resistencias.....	18
2.3. Farmacocinética.....	21
2.3.1. Absorción.....	22
2.3.2. Distribución.....	25
2.3.3. Metabolismo y eliminación.....	25
2.4. Toxicidad y reacciones adversas.....	28
2.5. Indicaciones terapéuticas.....	30
2.6. Integración farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD). Índices PK-PD.....	32
2.7. Justificación del trabajo y objetivos.....	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1 Protocolo y diseño experimental.....	62

3.1.1. Estudio farmacocinético de oxitetraciclina tras administración única oral en cerdos.....	63
3.1.2. Estudio farmacocinético de oxitetraciclina tras administración múltiple oral en cerdos.....	64
3.2. Método analítico de oxitetraciclina en plasma de cerdos.....	67
3.2.1. Procedimiento de extracción de oxitetraciclina. Condiciones cromatográficas.....	68
3.2.2. Validación del método analítico de oxitetraciclina en plasma de cerdo.....	70
3.3. Análisis de datos.....	75
3.4. Fármacos y reactivos.....	80
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Farmacocinética de oxitetraciclina tras administración única oral en cerdos.....	82
4.1.1. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina tras administración única oral.....	82
4.1.2. Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración única oral.....	85
4.2. Farmacocinética de oxitetraciclina tras administración múltiple oral durante 7 días en cerdos.....	87
4.2.1. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral.....	87
4.2.2. Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral.....	92
4.3. Índices PK/PD correlacionados con la eficacia del antibiótico.....	95
5. DISCUSIÓN.....	99
6. CONCLUSIONES.....	104
7. BIBLIOGRAFÍA.....	107

1. RESUMEN

Introducción. La oxitetraciclina, antibiótico de amplio uso en medicina veterinaria, pertenece al grupo de las tetraciclinas. Inhibe la síntesis de proteínas en la bacteria a nivel ribosomal. La oxitetraciclina presenta principalmente una acción bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como también frente a otros microorganismos tales como micoplasmas, espiroquetas, clamidias y rickettsias. Se clasifica en la actualidad de acuerdo con la cinética de muerte bacteriana como co-dependiente. En la bibliografía científica existen trabajos publicados de farmacocinética de oxitetraciclina en distintas especies animales, sin embargo hay escasos trabajos realizados en el cerdo. Dado que es necesario conocer la disposición de un fármaco en la especie animal estudiada para diseñar un adecuado régimen de dosificación, los objetivos del presente trabajo han sido: (i) describir el perfil farmacocinético de la oxitetraciclina tras administración oral única y múltiple en cerdos (*Sus scrofa domestica*) y (ii) realizar el análisis PK-PD para predecir la eficacia terapéutica del régimen de dosificación.

Material y Métodos. Se utilizaron 10 cerdos sanitariamente sanos con un peso medio de 60 kg. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los requerimientos éticos de bienestar animal. Los animales fueron distribuidos en tres grupos (Grupo 1, 4 cerdos, Grupo 2, 4 cerdos y Grupo 3, 2 cerdos). A los animales del Grupo 1, se les administró un pienso que contenía una concentración de oxitetraciclina de 1 g/kg, equivalente a una dosis oral única de 5 mg/kg p.v. A los animales del Grupo 2, se les administró durante 7 días un pienso que contenía una concentración de oxitetraciclina de 1 g/kg, equivalente a una dosis oral múltiple de 30 mg/kg p.v./día durante 7 días consecutivos. Los animales del Grupo 3, no recibieron tratamiento y se emplearon para recoger plasma blanco para utilizarlo en la validación del método analítico elegido. En los animales del Grupo 1 se tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo (15 y 30 min., 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración de oxitetraciclina) a partir de la vena yugular de cada uno de los animales. En los animales del Grupo 2 durante el primer y último día de administración se tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo (15 y 30 min., 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración) a partir la vena yugular de cada uno de los animales. Los días intermedios, es decir, días 2, 3, 4, 5 y 6 de tratamiento, se recogieron muestras de sangre a los 30 min., 2, 4, 8 y 24 h después de la administración. Las muestras de sangre se centrifugaron y se recogió individualmente el plasma que se almacenó a continuación a -45°C hasta el posterior análisis de las

concentraciones de oxitetraciclina. Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina se analizaron con un sistema HPLC equipado con una columna Teknokroma, Nucleosil 120 C18 (5 μm ; 12,5 x 0,4 cm). La fase móvil fue una mezcla de ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo: metanol en una proporción de 855:120:25. La curva de concentraciones medias plasmáticas vs tiempo se analizó usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El método analítico se validó cumpliendo los criterios recomendados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Las áreas de los picos en los cromatogramas de las muestras se cuantificaron usando la técnica del estándar externo mediante el uso de soluciones de referencia estándar de oxitetraciclina. Las curvas de calibrado para la oxitetraciclina fue lineal en un rango de 0,05-60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,05-60 $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido). El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La recuperación media de oxitetraciclina en plasma fue $> 84\%$. La precisión intra-día e inter-día presentó un coeficiente de variación $< 5,5\%$

Resultados y Discusión. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon tomando en cuenta la media de las concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina frente al tiempo usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768. Las curvas de las concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina frente al tiempo después de la administración oral (30 mg/kg p.v./día durante 7 días consecutivos) obtenidas, se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. La absorción oral fue rápida, como refleja la semivida de absorción ($t_{1/2a}$) ($1,371 \pm 0,116$ h) y el tiempo medio en el que se alcanzó la concentración máxima (T_{max}) ($2,816 \pm 0,118$ h). La concentración plasmática máxima (C_{max}) fue $3,455 \pm 0,143$ $\mu\text{g}/\text{ml}$. La semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) fue $11,434 \pm 0,438$ h. Las concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina disminuyeron lentamente presentándose niveles del antibiótico en un rango de 0,903 a 1,155 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 12 h después de la administración y en un rango de 0,401 a 0,576 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 24 h después de la administración. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los estudios farmacocinéticos a dosis oral única y múltiple de oxitetraciclina se correlacionaron con el parámetro farmacodinámico *in vitro* concentración mínima inhibitoria (CMI) al objeto de realizar el análisis PK-PD.

Conclusión. Este estudio presenta las propiedades farmacocinéticas y análisis PK-PD de oxitetraciclina en cerdos. El estudio aporta datos para un uso responsable de oxitetraciclina en la especie porcina sugiriendo un posible régimen de dosificación terapéutico.

ABSTRACT

Introduction. The oxytetracycline is a broad spectrum antibiotic widely used in veterinary medicine. It inhibits bacterial protein synthesis at the ribosome level. The oxytetracycline has a bacteriostatic action against gram positive and gram negative bacteria as well as mycoplasmas, spirochetes, chlamidiae and rickettsiae. It is currently classified according to its kinetics as co-dependant. There is some published studies regarding oxytetracycline pharmacokinetics in different animal species, however there are very few published research in pigs. It is mandatory to have a good knowledge of the antimicrobial in the species subject of study in order to design an effective dosing regime, therefore, the aim of this study is: (i) to describe oxytetracycline pharmacokinetics following both single and multiple oral administration in pigs (*Sus scrofa domestica*) and (ii) to establish the PK-PD integration in order to predict an effective therapeutic regime.

Material & Methods. 10 healthy pigs weighing an average of 60kg were used. The study was carried out following all ethical requirements regarding animal welfare. The animals were distributed in three groups (Group 1 with 4 pigs, Group 2 with 4 pigs and Group 3 with 2 pigs). Group 1 animals were treated with a single oral dose at 5mg/kg body weight in the pig feed. Group 1 animals received oxytetracycline in the pig feed at a concentration of 1g/kg, which represents a single oral dose of 5mg/kg body weight. Group 2 animals received oxytetracycline in the pig feed at a concentration of 1g/kg every 24 hours during 7 days, which represents a multiple oral dose of oxytetracycline at 30 mg/kg body weight/day for 7 consecutive days. Group 3 animals did not receive any treatment and were used to collect plain plasma in order to determine the validation of the analytical method. Blood samples from Group 1 animals were taken at different time intervals (15 and 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after the administration) from the jugular vein in each one of the animals. Samples from Group 2 animals were taken on the first and last day of oxytetracycline administration at different time intervals (15 and 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after the administration) from the jugular vein in each one of the animals. In the intermediate days (2, 3, 4, 5 and 6 days of treatment), blood samples were obtained at 30 minutes, 2, 4, 8 and 24 hours of oxytetracycline administration. Blood samples were centrifuged and plasma was individually separated and stored at -45°C until oxytetracycline concentrations were determined. Plasma concentrations of oxytetracycline were determined with a HPLC

system equipped with a Teknokroma column, Nucleosil 120 C18 (5 μm ; 12,5 x 0,4 cm). The mobile phase was a mixture of oxalic acid 0.01M:acetonitrile:methanol at the proportion 855:120:25. The mean plasma concentrations curve vs time was analysed using the Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). The analytical method was validated meeting the criteria recommended by European Medicines Agency (EMA). The peak areas in the chromatograms of the samples were quantified using the external standard technique by using standard referenced solutions of oxytetracycline. Calibrating curve for oxytetracycline was lineal in a range of 0.05-60 $\mu\text{g/ml}$ (0.05-60 $\mu\text{g/g}$ of plasma). The quantification limit (QL) was of 0.05 $\mu\text{g/ml}$ for plasma or 0.001 $\mu\text{g/g}$. The mean oxytetracycline recovered in plasma was > 84%. The intra-day and inter-day accuracy showed a coefficient of variation < 5.5%.

Results and Discussion. The pharmacokinetic parameters were calculated relating the mean of plasma concentrations of oxytetracycline against time using the Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) program. The plasma concentration curves of oxytetracycline obtained against time following its oral administration (at 30 mg/kg body weight during 7 consecutive days) suited appropriately a bicompartimental model for its kinetic study. The oral absorption was fast, as shown by the absorption half life ($t_{1/2a}$) which was 1.371 ± 0.116 h and the mean time at which the maximum concentration was achieved (T_{max}) was 2.816 ± 0.118 h. The maximum mean plasma concentration (C_{max}) was 3.455 ± 0.143 $\mu\text{g/ml}$. The mean elimination half life ($t_{1/2\beta}$) was 11.434 ± 0.438 h. The plasma concentrations of oxytetracycline decreased slowly showing antibiotic level at a concentration range of 0.903 to 1.155 $\mu\text{g/ml}$ at 12 hours after administration and at a range of 0.401 to 0.576 $\mu\text{g/ml}$ at 24 hours after the administration. The pharmacokinetic parameters obtained in the pharmacological study at a single dose and multiple doses of oxytetracycline were correlated with the *in vitro* pharmacodynamics parameter MIC (minimal inhibitory concentration) in order to perform the PK-PD analysis.

Conclusion. This study presents the pharmacokinetic properties and PK-PD analysis of oxytetracycline in pigs. The study provides data for a responsible use of oxytetracycline in pigs suggesting a possible therapeutic dosing regimen.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Origen y aspectos generales de las tetraciclinas

2.1.1. Historia de la oxitetraciclina

Las tetraciclinas son la segunda clase de antibióticos de amplio espectro descubierto después de la penicilina. La oxitetraciclina fue descubierta por Finlay y colaboradores en el año 1950 (FINLAY *et al.*, 1950). Al contrario que el descubrimiento de la penicilina (descubierta por Fleming en el año 1929), el desarrollo de la oxitetraciclina fue consecuencia de un trabajo organizado en busca de un agente terapéutico frente a bacterias, rickettsias y espiroquetas y ciertos “virus y organismos protozoarios” (WRIGHT y TSCHAN, 1953). El programa de investigación consistió en la toma de 100.000 muestras de tierra de multitud de localizaciones en distintos continentes (KANE *et al.*, 1950).

Después de un prolongado periodo de muestreo de tierra, se obtuvo el antibiótico oxitetraciclina de un actinomicete llamado *Streptomyces rimosus*, llamado así por su aspecto “agrietado” al crecer sobre el medio agar. Fue el famoso químico americano R.B. WOODWARD el que dos años después formuló la estructura química de la oxitetraciclina (STEPHENS *et al.*, 1952), posibilitando a los laboratorios Pfizer la producción del antibiótico, bajo el nombre de “Terramicina”. El descubrimiento de WOODWARD facilitó el descubrimiento de un derivado de la oxitetraciclina, la doxiciclina, que es uno de los antibióticos más comunes de uso actualmente en medicina humana y veterinaria. El descubrimiento de la oxitetraciclina supuso una revolución en el mundo de la Medicina. Pronto la oxitetraciclina se comenzó a utilizar para el tratamiento de una multitud de patologías como las enfermedades venéreas, estreptococos, neumonía, disentería, difteria, tracomas y tifus entre otras enfermedades más.

De esta manera las tetraciclinas se clasifican en tres generaciones. Las de primera generación (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, rolitetraciclina, limeciclina, clomociclina); las de segunda generación (metaciclina, doxiciclina, minociclina); y las de tercera generación (glicilciclinas), como se muestra en la **Tabla 1**.

La oxitetraciclina (producto de *Streptomyces rimosus*) fue tan solo la segunda tetraciclina descubierta tras la clortetraciclina. Más adelante se descubrieron la tetraciclina (año 1953), la demeclociclina o la demetilclortetraciclina (1957), la

rolitetraciclina (1958) y la limeciclina (1956) (CHOPRA y ROBERTS, 2001; BAEYENS y DEL POZO, 2008). La clortetraciclina y la oxitetraciclina son antibióticos naturales que sólo se pueden obtener mediante fermentación; por otro lado, la demetilclortetraciclina y la tetraciclina se pueden obtener por fermentación o semisíntesis. Las moléculas descritas hasta ahora forman el grupo de las denominadas tetraciclinas de primera generación, caracterizadas por tener una absorción reducida y una baja lipofilia, todas ellas pueden administrarse por vía oral con excepción de la rolitetraciclina (AGWUH y MACGOWAN, 2006). La metaciclina sintetizada en el año 1961, doxiciclina en el año 1966 y la minociclina en el año 1967, forman el grupo de las tetraciclinas de segunda generación, producto de reacciones de semisíntesis desarrolladas para aumentar la solubilidad y la absorción, y prolongar la semivida biológica de la molécula, y están disponibles en fórmulas orales e intravenosas. Se han desarrollado técnicas de regeneración protoplasmática en cultivos de *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces aureofaciens* con el fin de mejorar las condiciones de producción de los antibióticos oxitetraciclina y clortetraciclina (ISAEVA y VOEIKOVA, 1990). Una nueva subfamilia, las tetraciclinas de tercera generación, está constituida por las glicilciclinas especialmente desarrolladas con el fin de vencer los problemas de resistencias y cuyo producto más utilizado es la tigeciclina, de potente actividad antibacteriana y amplio espectro de acción (CHOPRA Y ROBERTS, 2001; BHATTACHARYA *et al.*, 2009; MEDIAVILLA *et al.*, 2008) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales miembros de la clase de las tetraciclinas

Nombre químico	Nombre genérico (Generación)	Nombre comercial	Año de descubrimiento	Vía de administración
7, Clortetraciclina	Clortetraciclina (1ºgen) (a)	Aureomicina	1948	Oral
5, Hidroxitetraciclina	Oxitetraciclina (1ºgen) (a)	Terramicina	1948	Oral y parenteral
Tetraciclina	Tetraciclina (1ºgen) (b)	Acromicina	1953	Oral
6-demetil-7-clortetraciclina	Demetilclortetraciclina (1ºgen) (b)	Declomicina	1957	Oral
2- <i>N</i> -Pirrolidinometiltetraciclina	Rolitetraciclina (1ºgen) (c)	Reverin	1958	Oral
2- <i>N</i> -Lisinometiltetraciclina	Limeciclina (1ºgen) (c)	Tetralisal	1961	Oral y parenteral
<i>N</i> -Metilol-7-clortetraciclina	Clomociclina (1ºgen) (c)	Megaclor	1963	Oral
6-Metileno-5-hidroxitetraciclina	Metaciclina (2ªgen) (d)	Rondomicina	1965	Oral
6-Deoxi-5-hidroxitetraciclina	Doxiciclina (2ªgen) (d)	Vibramicina	1967	Oral y parenteral
7-Dimetilamino-6-demetil-6-deoxitetraciclina	Minociclina (2ªgen) (d)	Minocin	1972	Oral y parenteral
9-(<i>t</i> -butilglicilamido)-minociclina	Butilglicilamidominociclina (Glicilciclina) (3ªgen) (e)	Tigeciclina	1993	Parenteral

- (a) Producidas por dos especies diferentes de *Streptomyces*; descubiertas a finales de los años 1940
 (b) Obtenidas a partir de *Streptomyces* en la década de 1950
 (c) Derivados semisintéticos caracterizados por su hidrosolubilidad
 (d) Derivados semisintéticos de las primeras
 (e) Grupo más reciente siendo la tigeciclina el representante más importante.

En la actualidad, la cría de ganado porcino es la que más antibióticos consume a nivel mundial, por encima del ganado bovino. Las tetraciclinas en general son los antibióticos más utilizados a nivel mundial en ganado porcino. Por ejemplo, en el Reino Unido, de acuerdo con el Veterinary Medicines Directorate (VMD) (BURCH, 2012) de las 387 toneladas de antibióticos utilizados en animales en 2007, el 45% fueron tetraciclinas, el 19% sulfonamidas/trimetoprim, el 19% beta-lactámicos y el 9% macrólidos. Según estimaciones realizadas por BURCH (2012), sólo en 2007 en el Reino Unido, la especie porcina supuso el consumo de unas 206 toneladas de antibióticos; siendo también la especie animal que más antimicrobianos consume.

En el año 2009 en España, las ventas totales de antimicrobianos representaron un total de 1102,35 Tm; aproximadamente el 80% del total de las ventas corresponden a cuatro clases de antimicrobianos: tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprim, β -

lactámicos y lincosamidas. Las tetraciclinas (31,23%) son el grupo mayoritario (AEMPS, 2011) seguidas de las sulfonamidas y trimetoprim (22,29%), y de β -lactámicos (16,29%). A nivel Europeo, la venta de tetraciclinas para uso veterinario representa un 37%, los β -lactámicos un 23% y las sulfonamidas y trimetoprim un 11% (EMA, 2013).

2.1.2. Estructura química de la oxitetraciclina y propiedades físico-químicas

Las tetraciclinas son sustancias cristalinas ligeramente amarillas, inodoras y levemente amargas; son anfóteras ya que en solución acuosa forman sales tanto con ácidos como con bases. Las tetraciclinas son estables en forma de polvo pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestables a pH superiores a 7,0. Se ionizan con soluciones ácidas de pH inferiores a 2.

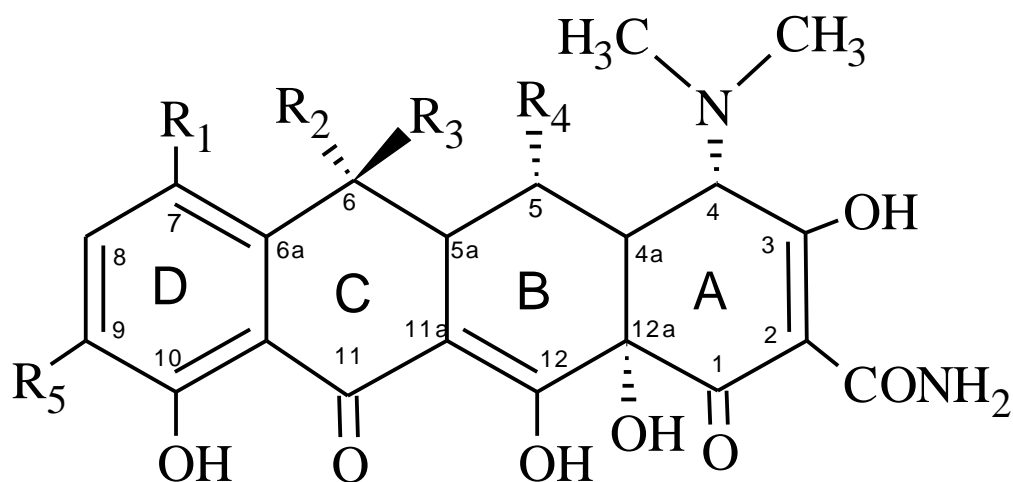
La tetraciclinas son poco solubles en pH ácido, pero pueden hacerse más solubles al combinarse con sodio o clorhidrato. En solución acuosa neutra, la clortetraciclina pierde la mayor parte de su actividad en un día, la oxitetraciclina en tres o cuatro días y la tetraciclina en unas tres semanas.

La oxitetraciclina en particular es un polvo cristalino amarillo, soluble en agua y que se disuelve en soluciones diluídas de ácidos o bases. El peso molecular de la oxitetraciclina es de 460,434 g/mol.

Existen dos partes en la molécula que contienen distintos grupos funcionales. La parte inferior de la molécula (como se muestra en la **Figura 1**), posee una serie de grupos funcionales de oxígeno (NELSON, 1998). La mayoría de las modificaciones sintéticas a lo largo de esta parte suponen una pérdida de la actividad biológica. Sin embargo, las modificaciones sintéticas de la parte superior de la molécula, dan lugar a nuevos compuestos con una mayor actividad biológica, y en algunos casos con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes a otras tetraciclinas. Además, la modificación de los grupos funcionales de esta parte puede inducir cambios en el tamaño, forma, carga, densidad electrónica y polaridad. Estas modificaciones pueden producir cambios en la solubilidad, lipofilia, y afinidad con las moléculas diana. No obstante, las tetraciclinas con mayor actividad antibacteriana, en general solo difieren entre ellas por sus características farmacocinéticas.

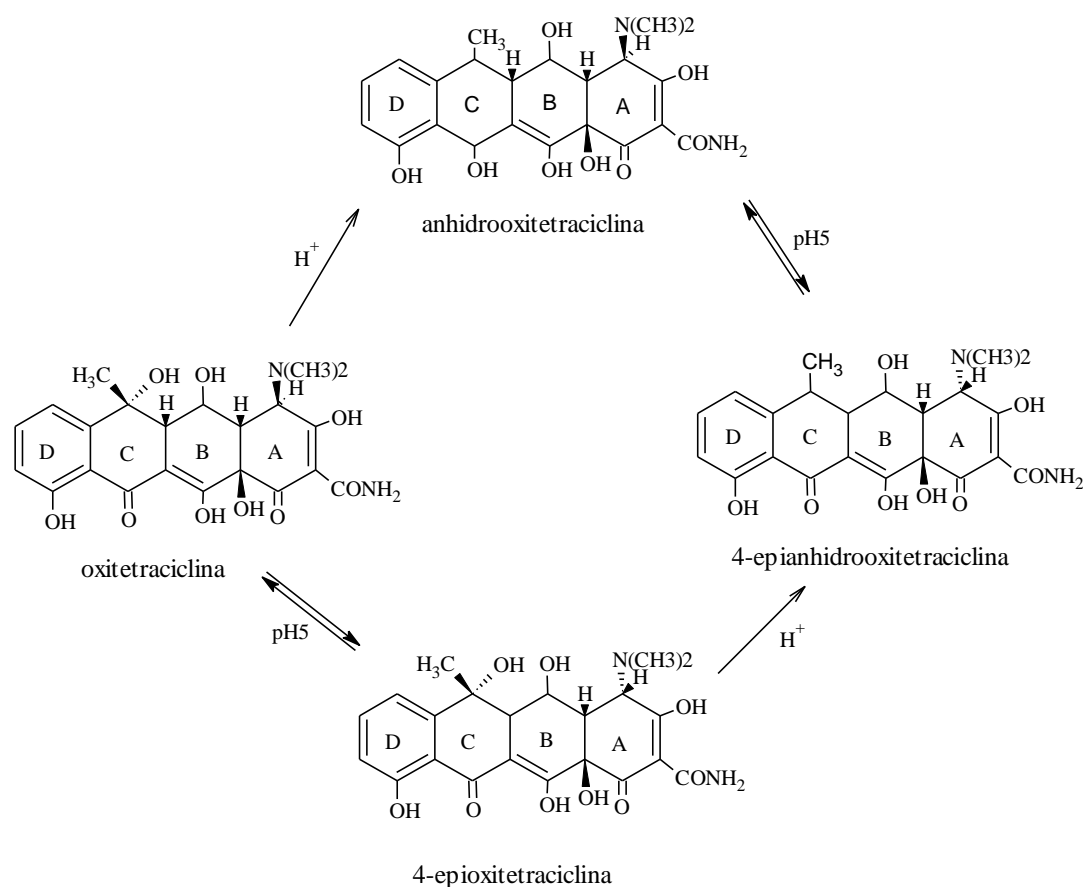
El nombre de la IUPAC para la oxitetraciclina es (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,11,12a-hexahidroxi-6-metil-1,12-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,12,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida; siendo su fórmula química abreviada $C_{22}H_{24}N_2O_9$ (**Figura 1**). Su número CAS (Chemical Abstract Service) es el 79-57-2.

Figura 1. Fórmula química de la oxitetraciclina



La oxitetraciclina a valores de pH intermedios, se epimeriza en el carbono en posición 4 a epioxitetraciclina a través de la función dimetilamino que interacciona con el -OH del carbono en posición 12a. En medio acuoso esto ocurre rápidamente a pH 3-5 dando lugar a una mezcla en la que los dos epímeros se encuentran en igual proporción, sin embargo la proporción en estado de equilibrio entre la oxitetraciclina en estado natural y sus epímeros es de 2/3 y 1/3 respectivamente. Las 4-epitetraciclinas son poco activas como antibióticos, con una actividad antimicrobiana que oscila entre el 2 y el 5% con respecto a la tetraciclina madre (MITSCHER *et al.*, 1972), como se muestra en la **Figura 2**.

Figura 2. Epimerización de la oxitetraciclina a pH entre 3 y 5



2.1.3. Relación estructura-actividad de la oxitetraciclina

Las características estructurales que confieren la actividad antibacteriana a las tetraciclinas están bien determinadas (DAX, 1997; MITSCHER, 1978; ROGALSKI, 1985). Sin embargo, más recientemente, se han descubierto nuevos aspectos de la relación estructura-actividad. Se ha realizado un esfuerzo para extender la vida útil terapéutica de esta clase de antibióticos, ya que las bacterias desarrollan resistencia a tetraciclinas de primera y segunda generación a través de una protección ribosomal y mecanismos basados en bombas de exoflujo.

Las moléculas de tetraciclina comprenden un núcleo lineal de cuatro anillos fusionados. A los anillos designados como A, B, C y D (**Figura 1**) se adhieren grupos funcionales. La tetraciclina más sencilla que muestra una actividad antibacteriana

detectable es la 6-deoxi-6-demetiltetraciclina (**Figura 3**). A esta estructura se la podría considerar como el grupo farmacóforo (MITSCHER, 1978).

Las características más importantes para la actividad antibacteriana de las tetraciclinas es el mantenimiento de los cuatro anillos lineares fusionados, las configuraciones α -estereoquímicas en las posiciones 4a, 12a (entre las uniones de los anillos A y B, y 4 (grupo dimetilamino) y la conservación del sistema keto-enol (posiciones 11, 12 y 12a) en la proximidad del anillo fenólico D.

Las tetraciclinas son fuertes agentes quelantes (BLACKWOOD, 1985; CHOPRA *et al.*, 1992) y ambas propiedades antibacterianas y farmacocinéticas están influenciadas por la quelación de iones metálicos (como se muestra a continuación).

Los lugares de quelación incluyen: el sistema β -dicetona (posiciones 11 y 12) y el enol (posiciones 1 y 3) y grupos carboxamida (posición 2) del anillo A (BLACKWOOD, 1985; CHOPRA *et al.*, 1992). Las gliciliclinas, como otros derivados de las tetraciclinas también forman complejos quelantes con cationes divalentes (SOMEYA *et al.*, 1995). Al re-emplazar la unión carboxamida del C-2 con otros grupos generalmente da lugar a análogos de actividad antibacteriana inferior (MITSCHER, 1978), probablemente porque las bacterias acumulan pocas de estas moléculas (CHOPRA, 1986). Sin embargo la adición de sustituyentes al nitrógeno amido puede conferir una solubilidad al agua significativa, como en el caso de la rolitetraciclina y limeciclina (MITSCHER, 1978; ROGALSKI, 1985) (**Tabla 1**). De acuerdo con estas observaciones, las sustituciones en las posiciones 1, 3, 4a, 10, 11 o 12 son desventajosas para la actividad antibacteriana (MITSCHER, 1978). No obstante, pueden darse otras sustituciones en diferentes posiciones en los anillos B, C y D, dando lugar a las tetraciclinas de uso actual, además de las moléculas de gliciliclinas.

Estudios más amplios de relación estructura-actividad revelan que, salvo una excepción, cada uno de los anillos del núcleo linear tetracíclico deben contener 6 miembros y en particular carbocíclicos para que las moléculas tengan actividad antibacteriana (ROGALSKI, 1985). Sin embargo, la 6-tiatetraciclina, que posee un átomo sulfuro en la posición 6 del anillo C, es una excepción a la regla de que una estructura de 6 miembros de anillos carbocíclicos es necesaria para la actividad antibacteriana, ya que las moléculas en estas series tienen una potente actividad antibacteriana (CHOPRA, 1994; ROGALSKI, 1985). No obstante, se ha establecido

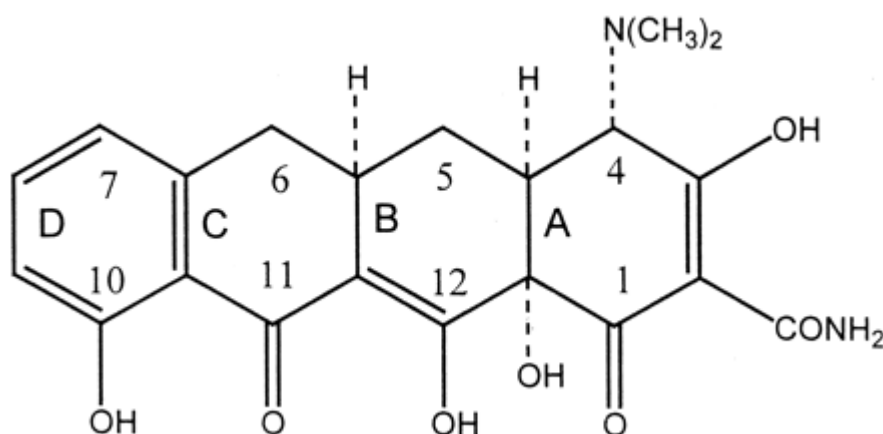
que un número de otros análogos de las tetraciclinas, referidos colectivamente como tetraciclinas atípicas (CHOPRA, 1994; CHUNG *et al.*, 1999), muestran una relación estructura-actividad diferente a la mayoría de las tetraciclinas. Estas moléculas, que también incluyen las anhidrotetraciclinas, 4-epi-anhidrotetraciclinas y quelocardina, parecen perturbar directamente la membrana citoplasmática de las bacterias, confiriéndoles un efecto bactericida (CHOPRA, 1994; OLIVA y CHOPRA, 1992; OLIVA *et al.*, 1992).

Esto contrasta con las tetraciclinas típicas, que interactúan con el ribosoma para inhibir la síntesis de proteína bacteriana y producir un efecto bacteriostático reversible. La propiedad de disrupción de la membrana de las tetraciclinas atípicas está probablemente relacionada con la relativa planaridad de los anillos B, C, y D de manera que predomine una molécula lipofílica no ionizada. En la interacción con la célula, las tetraciclinas atípicas se quedan preferentemente atrapadas en el ambiente hidrofóbico de la membrana citoplasmática, interfiriendo en su función. Estas moléculas no tienen ningún interés como candidatos terapéuticos porque ocasionan efectos adversos en humanos (ROGALSKI, 1985) que están probablemente relacionados con su capacidad para interactuar de manera no específica con las membranas celulares tanto eucarióticas como procarióticas.

Ha habido un resurgir generalizado de resistencias a nivel ribosomal tanto en tetraciclinas de primera como de segunda generación (ACAR *et al.*, 1977; ACAR, 1977; BIGGS y FRAMATICO, 1999; CHOPRA *et al.*, 1992; FALKOU, 1975; GILLESPIE *et al.*, 1986; HORAUD *et al.*, 1991; KARIUKI *et al.*, 1992; KEHRENBURG *et al.*, 1998; LEVY *et al.*, 1999; MANAVATHU *et al.*, 1990; ROBERTS 1994, 1996 y 1997; WASTESON *et al.*, 1994). Para intentar restaurar el potencial de las tetraciclinas como una clase eficaz de antibióticos de amplio espectro, se llevó a cabo una investigación a principios de los años 1990 para descubrir nuevos análogos que pudieran poseer actividad frente a microorganismos resistentes a miembros más antiguos de esta clase de antibióticos y que tuviesen actividad contra microorganismos susceptibles a las tetraciclinas. Así surgieron las 9-gliciniltetraciclinas (gliciliclinas) (BARDEN *et al.*, 1994; SUM *et al.*, 1994; SUM y PETERSEN, 1999; TESTA *et al.*, 1993) (**Tabla 1**). Intentos anteriores a la introducción de sustituyentes en la posición 9 de la molécula, por ejemplo, 9-nitro, 9-amino, y 9-hidroxi conllevó a la síntesis de análogos con poca actividad antibacteriana (MITSCHER, 1978; ROGALSKI, 1985). Sin embargo, durante

los años noventa, un equipo de los laboratorios Lederle (ahora American Home Products), describió que los derivados 9-acilamido de la minociclina, mostraban actividades antibacterianas típicas de las primeras tetraciclinas pero sin actividad frente a organismos resistentes a tetraciclinas (BARDEN *et al.*, 1994). No obstante, cuando el grupo acilo fue modificado para incluir una unión *N-N*-diacilamina, por ejemplo como en la 6-demetil-6-deoxitetraciclina y derivados de la minociclina (GAR-936), no solo se retuvo la actividad antibacteriana, sino que además los compuestos mostraron una actividad antibacteriana frente a bacterias que contenían genes tet responsables de la protección de mecanismos de exoflujo de las primeras tetraciclinas. [(Tet(A)-a Tet(D) y Tet(K)] y protección ribosomal [Tet(M)] (BARDEN *et al.*, 1994; SUM *et al.*, 1994; SUM y PETERSEN, 1999; TESTA *et al.*, 1993). Estos hallazgos se extendieron al derivado de la minociclina 9-*t*-butilglicilamido (**Tabla 1**). Estos datos sugieren que las relaciones estructura-actividad puedan haberse definido por actividad frente a cepas bacterianas que expresan protección contra mecanismos de exoflujo o ribosomales que abarcan los requisitos anteriores para la actividad frente a cepas bacterianas susceptibles a tetraciclinas, pero además necesitan una sustitución *N*-alquil glicamido en la posición 9 de la molécula.

Figura 3. Estructura de la 6-deoxi-6 demetiltetraciclina, el grupo farmacóforo (MITSCHER, 1978)



2.2. Acción farmacológica

2.2.1. Mecanismo de acción

Las tetraciclinas son antibióticos de acción principalmente bacteriostática. Esta acción está mediada por una inhibición de la síntesis proteica bacteriana en el proceso de reproducción y crecimiento celular, al ligarse al ribosoma bacteriano 30S (CONNAMACHER y MANDEL, 1965) y evitar la llegada al complejo aminoacil ARNt al sitio receptor (A) en el complejo ARNm-ribosoma (**Figura 4**). Esta unión es irreversible, e impide la incorporación de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídica, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas (SCHNAPPINGER y HILLEN, 1996).

Para que los antibióticos lleguen a los ribosomas son necesarios dos procesos: un primer proceso de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos formados por las proteínas porinas (membrana del germen patógeno). La minociclina y la doxiciclina son más lipófilas que otras tetraciclinas y atraviesan la membrana lipídica de forma directa. El segundo proceso implica un transporte activo, que permite el paso a todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplásmica interna. Este último proceso puede requerir un transportador proteico periplasmático.

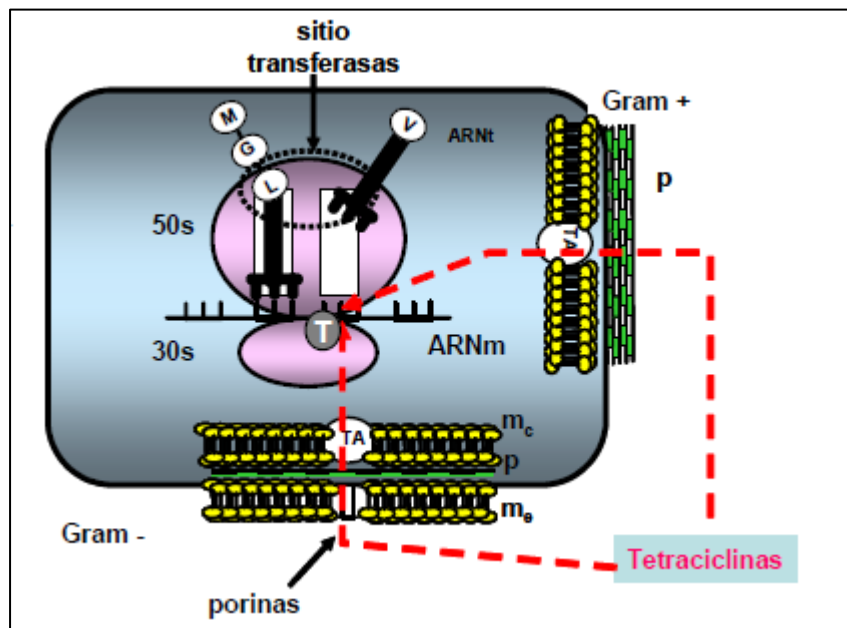
La síntesis de proteínas se inhibe de forma inmediata y total tras el tratamiento de los organismos sensibles a esta clase de antibióticos (GALE y FOLKERS, 1953; HASH *et al.*, 1964). Existe mayor afinidad por la unión a la subunidad ribosómica 30S en comparación con la unión a la subunidad 50S (DAY 1966; MAXWELL; 1968). Se han realizado estudios utilizando técnicas de fluorescencia para discernir cuál de estas interacciones es la más significativa para la acción de las tetraciclinas, estimando el número de lugares de unión disponibles en los ribosomas de *E.coli* (FEY *et al.* 1973). La conclusión de estos estudios es que una molécula se une en una interacción fuerte con cada subunidad 50s y que tres moléculas se unen en una interacción débil a la subunidad 30S. Se ha sugerido que la unión fuerte no es la interacción inhibitoria, sino que la unión débil a la subunidad 30S es la unión que conduce al efecto antibacteriano.

Las tetraciclinas no inhiben la unión del cloranfenicol (VAZQUEZ, 1964) o de la lincomicina (WEISBLUM y DAVIES, 1968) a los ribosomas, antibióticos que es

conocido se unen a la subunidad 50S del ribosoma, hecho que sugiere que las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S (**Figura 4**).

La unión está limitada por la presencia de iones magnesio, y se reduce a bajas concentraciones de éste (BODLEY y ZIEVE, 1969).

Figura 4. Inhibición de la síntesis proteica bacteriana por tetraciclinas



2.2.2. Espectro antimicrobiano

El espectro antimicrobiano de las tetraciclinas es muy amplio. Incluye a gran parte de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. También son efectivas contra algunos micro-organismos resistentes a agentes que ejercen sus efectos sobre la pared de la célula bacteriana, por ejemplo: *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y algunos protozoos (BAXTER y McKELLAR, 1995).

En general, las bacterias Gram positivas responden a menores concentraciones de tetraciclinas que las bacterias Gram negativas (KAPUSNIK-UNER *et al.*, 1996), sin embargo, este grupo de fármacos rara vez está indicado en infecciones causadas por bacterias Gram positivas debido a las resistencias bacterianas que han desarrollado y a que actualmente se dispone de opciones más selectivas para estos microorganismos.

Las tetraciclinas en humanos están indicadas en las infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y a muchas cepas de *Neisseria meningitidis* (CMI₉₀ = 1 - 2 µg/ml), pero se ha observado que si se utiliza como agente único en la gonorrea, se desarrollan resistencias (KNAPP *et al.*, 1987). Casi todas las cepas de enterococos son resistentes a las tetraciclinas; estreptococos del grupo B muestran sensibilidad en el 50% de los casos y sólo el 65% de los casos de infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* son sensibles (STANDIFORD, 1995). Al igual que el cloranfenicol, todas las tetraciclinas son muy efectivas contra *Rickettsia*, responsable de la fiebre de las montañas rocosas o el tifus murino.

Las tetraciclinas son mucho menos activas que el cloranfenicol, la clindamicina o ciertos antibióticos betalactámicos frente a *Bacteroides fragilis*, por lo que estos agentes han reemplazado a las tetraciclinas en el tratamiento de la mayoría de las infecciones producidas por bacterias anaeróbicas.

Los microorganismos son considerados sensibles si la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las tetraciclinas es igual o superior a 1 µg/ml, medianamente sensibles si la CMI está comprendida entre 2 y 8 µg/ml, y resistentes si la CMI es superior a 8 µg/ml (**Tabla 2**), siguiendo las normas del *National Comitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Teniendo en cuenta este criterio, muchas especies de Micoplasmas son sensibles a la tetraciclina, si bien, algunas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de *Mycoplasma bovis* han desarrollado resistencias (PRESCOTT y BAGGOT, 2000). Las infecciones causadas por bacilos (Brucelosis, Tularemia, Actinomicosis) son especialmente sensibles a estos fármacos. El espectro de actividad de las tetraciclinas incluye una gran cantidad de bacterias como *Neisseria*, *Listeria*, *Shigella* spp. Además las tetraciclinas en concentraciones elevadas presentan actividad antibiótica frente a los protozoos *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* y *Plasmodium falciparum*.

En cuanto al espectro antimicrobiano de la oxitetraciclina en las distintas enfermedades infecciosas producidas por bacterias en medicina porcina, vease el apartado 1.5 Indicaciones terapéuticas.

Tabla 2. Actividad antibacteriana *in vitro* de las tetraciclinas (PRESCOTT y BAGGOT, 2000)

Microorganismo	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
Aerobias grampositivas		
<i>A. pyogenes</i>	25	64
<i>B. anthraix</i>	0,12	4
<i>C. pseudotuberculosis</i>	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>C. renal</i>	3,1	4
<i>E. rhusiopathiae</i>	0,2	0,25
<i>L. monocytogenes</i>	0,25	1,0
<i>R. equi</i>	2,0	4,0
<i>S. aureus</i>	0,3	>64
<i>S. dysgalactiae</i>	4,0	>32
<i>S. uberis</i>	0,5	0,5
<i>Estreptococos de grupo</i>	1,0	2,0
Anaerobias gram positivas		
<i>Actinomyces spp</i>	0,5	1.0
<i>C. perfringens</i>	0,1	32
<i>Clostridium spp</i>	0,1	8
Anaerobias gram negativas		
<i>Actinobacillus spp</i>	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>A. pleurpneumoniae</i>	0,8	≥16
<i>B. bronchiseptica</i>	1,6	≥16
<i>B. canis</i>	0,09	0,25
<i>C. jejuni</i>	0,12	>64
<i>E. coli</i>	4,0	>64
<i>H. equigenitalis</i>	≤ 0,2	0,4
<i>H. somnus</i>	1,6	2
<i>K. pneumoniae</i>	2,0	>16
<i>T. hyodysenteriae</i>	0,4	50
<i>Leptospira spp</i>	1,0	4,0
<i>P. multocida (bovino)</i>	0,5	>128
<i>P. multocida (porcino)</i>	0,4	0,4
<i>P. haemolytica</i>	1,0	>128
<i>Proteus sp</i>	>16	>16
<i>Pseudomonas</i>	>16	>16
<i>S. typhimurium</i>	>16	>16
Anaerobias gramnegativas		
<i>B. fragilis</i>	12,5	25
<i>D. nodosus</i>		0,12
<i>B. asaccharolyticus</i>	1,0	2,0
Micoplasmas		
<i>M. bovirhinis</i>	6,2	12,5
<i>M. hyopneumoniae</i>	0,16	0,8
<i>M. hyorhinis</i>	0,4	0,8

2.2.3. Resistencias

A nivel global, las resistencias bacterianas se han convertido en uno de los mayores problemas tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. El uso de los antibióticos en la cría animal se ha identificado como un factor de riesgo en el desarrollo de bacterias resistentes a tetraciclinas y que pueden transferirse al hombre mediante distintas rutas, por ejemplo, mediante el consumo humano de productos

animales, por exposición a microorganismos resistentes por contacto con los animales, y la contaminación del suelo y superficies acuáticas mediante residuos que contienen antibióticos y microorganismos resistentes. Se ha demostrado que la forma de almacenamiento de los residuos, el nivel de formación de los ganaderos, incluyendo el número de otros antibióticos utilizados de forma racional dependiendo de las enfermedades y el manejo de los residuos procedentes de la granja juegan un papel importante en la aparición de resistencias (ARIAS-ANDRÉS *et al.*, 2014). La exposición a tetraciclinas no solo puede aumentar el nivel de resistencia a antibióticos entre bacterias de la flora intestinal del animal, sino que además este nivel de resistencia aumenta entre las bacterias patógenas. Cuando existen altos niveles de bacterias patógenas resistentes, el tratamiento con tetraciclinas puede no ser eficaz. La bacteria *Escherichia coli* (*E. Coli*) es un indicador de resistencia bacteriana. Para minimizar la aparición de resistencias bacterianas es necesario reducir el uso de las tetraciclinas, o alternativamente, reducir los niveles de bacterias resistentes en el tracto gastrointestinal del animal, lo que se traduciría en una reducción de la carga bacteriana en el ambiente, disminuyendo la transmisión de genes resistentes. Esto es particularmente importante en aquellas especies bacterianas comunes en animales y en humanos; por ejemplo, *E. coli* en los alimentos que ingieren los humanos a diario. Como las estirpes de *E. coli* resistentes a antibióticos son ubicuas tanto en humanos como en animales, esta bacteria se utiliza como indicador de problemas de resistencias tanto en animales como en humanos (ARIAS-ANDRÉS *et al.*, 2014).

Tanto en bacterias Gram-positivas como en bacterias Gram-negativas, el origen de las resistencias a tetraciclinas parece ser cromosómico o extracromosómico. En microorganismos Gram-negativos, la resistencia a tetraciclinas es debida a la presencia de plásmidos-R y es una resistencia inducida por una concentración inferior a la concentración mínima inhibitoria (CHOPRA y HOWE, 1978; LEVY y MCMURRY, 1978; CHOPRA y ROBERTS, 2001).

Los estudios de vigilancia y monitorización de resistencias proveen información sobre la aparición de resistencias en cerdos en distintas partes del mundo. La aparición de resistencia de *E. coli* a antibióticos en el cerdo en distintas partes del mundo está siendo descrita por el AURES (Austrian Resistance Report), cada año desde el 2004 tanto para humanos como para el sector veterinario. Los límites de *E. coli* se determinan utilizando valores cutt-off o de corte epidemiológico basados en la distribución de la

concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico. Esto está determinado por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

La penetración de las tetraciclinas en el citoplasma bacteriano se realiza mediante difusión pasiva a través de los poros de la pared bacteriana y posteriormente por mecanismos de transporte activo (SCHNAPPINGER y HILLEN, 1996). Precisamente, la alteración del sistema del transporte activo provoca una disminución en la captación de las tetraciclinas por los microorganismos. Esta resistencia está mediada por plásmidos y es inducible.

También se han descrito resistencias cruzadas entre las diferentes tetraciclinas. Esta resistencia parece ser menor para la doxiciclina y la minociclina que para otras tetraciclinas, debido a su mayor lipofilia, lo que les permite penetrar dentro de las bacterias sin necesidad de transporte activo.

Han sido descritos otros mecanismos de resistencias como el menor acceso de las tetraciclinas al ribosoma debido a la existencia de proteínas que los protegen y por la síntesis de enzimas inactivadoras de las tetraciclinas (SPEER *et al.*, 1992; SCHNAPPINGER Y HILLEN, 1996), pero estas resistencias son de aparición lenta.

Muchas cepas de estafilococos y estreptococos e incluso de neumococos, son resistentes a tetraciclinas (SCHWARZ *et al.*, 1998). En estafilococos existen dos modelos fenotípicos de resistencia a las tetraciclinas. Uno de ellos es inducido, por la presencia del antibiótico tetraciclina pero no minociclina y mediado por plásmidos de resistencia transmisibles por transducción (mediante bacteriófagos). El otro modelo es una resistencia constitutiva a ambos (minociclina y tetraciclina) y se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano (CHOPRA *et al.*, 1974; ASHESHOV, 1975)

Las pseudomonas y enterobacterias en general son resistentes a tetraciclinas (LI *et al.*, 1994). En enterobacterias, en las que han sido caracterizados distintos determinantes, la transmisión de resistencias se produce por un breve contacto entre distintas especies de microorganismos patógenas y no patógenas de *E. coli* y *Salmonella* aunque también con especies de *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella*. El proceso de transmisión entre células bacterianas donantes y receptoras, es posible dentro de un amplio margen de temperatura (15-45°C) y de valores de pH (5,5 a 8). En el tracto gastrointestinal y en heces se producen las condiciones más favorables. El empleo fraudulento de tetraciclinas en animales como promotores del crecimiento ha originado

una presión selectiva en beneficio de la resistencia a estos antibióticos, así los gérmenes coliformes de la flora intestinal resistentes a las tetraciclinas predominan hasta llegar casi al 100% (SMITH y CRABB, 1957; LOKEN *et al.*, 1971; SMITH, 1975; LEVY *et al.*, 1976; AHART *et al.*, 1978; SMITH y LOWELL, 1981; MARSHALL *et al.*, 1986).

Los gonococos y pneumococos que son resistentes a la penicilina suelen serlo también a las tetraciclinas (DOERN *et al.*, 1998). También se ha demostrado que la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (LA-MRSA) es 100% resistente a la clindamicina, oxitetraciclina y tetraciclina en cerdos (PATCHANEE *et al.*, 2014).

Muchas especies de micoplasmas son sensibles, aunque se han observado algunas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de *Mycoplasma Bovis* que han desarrollado resistencia (PRESCOT y BAGGOT, 2000).

Se han descubierto decenas de genes resistentes a las tetraciclinas (*tet*) y oxitetraciclinas (*otr*); y es un campo que está en continua evolución. Así mismo se han identificado genes que codifican para proteínas de exoflujo, genes que codifican las proteínas de protección ribosomal, y genes que codifican para enzimas inactivadoras de tetraciclinas (ROBERTS, 2005).

2.3. Farmacocinética

Cuanto mayor es la liposolubilidad de una tetraciclina, mayor es su velocidad e índice de absorción, mayor será su unión a proteínas plasmáticas y más lenta su biotransformación, y como consecuencia, más prolongada su semivida biológica.

Según su liposolubilidad, las tetraciclinas se pueden clasificar en tres grupos:

1. Hidrosolubles: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y limeciclina -tienen una absorción oral incompleta.
2. Solubilidad media: como demeclociclina y metaciclina.
3. Liposolubles: doxiciclina y minociclina (que se absorben por completo)

2.3.1. Absorción

Todas las tetraciclinas administradas por vía oral se absorben en el estómago y en la primera porción del intestino delgado, siendo ésta mayor y más completa en estado de ayuno. Las tetraciclinas más hidrosolubles presentan una absorción relativamente lenta (T_{max} 2 a 4 horas) e incompleta (biodisponibilidad del 40 al 85) siendo T_{max} el parámetro farmacocinético que representa el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (C_{max}) del fármaco en sangre después de su administración por vía extravascular. La doxiciclina y la minociclina se absorben más rápidamente y de forma casi completa (T_{max} 0,5 a 1 hora), sin que apenas se afecte su biodisponibilidad en presencia de alimentos (STEIGBIEGEL *et al.*, 1968).

La absorción de las tetraciclinas puede verse disminuía por la ingestión simultánea de productos lácteos, hidróxido de aluminio, y distintas sales (calcio, magnesio, hierro o zinc) (ERICSSON *et al.*, 1982). La absorción también puede verse disminuía por la formación de complejos y cationes divalentes y trivalentes en el medio (ARONSON, 1980). La quelación del catión por parte del antibiótico provoca la alteración de la estructura química (CASWELL y HUTCHISON, 1971), reduciéndose la absorción hasta niveles mínimos, sobre todo en tetraciclinas de acción prolongada.

La clortetraciclina no se debe utilizar por vía intramuscular ya que es bastante irritante con una absorción pobre e irregular desde el punto de inyección. Esto no es así para la oxitetraciclina y la tetraciclina, ya que ambas poseen una mejor absorción intramuscular, detectándose en el plasma en unos 15 minutos, alcanzando su concentración máxima en 1 hora. Se mantiene en márgenes terapéuticos durante 12 horas, declinando posteriormente hasta ser indetectables transcurridas 24 horas de la administración. También influye el vehículo utilizado por esta vía y la formulación. Las distintas formulaciones dan lugar a velocidades de absorción diferentes, con la consiguiente variación en los parámetros farmacocinéticos (DAVEY *et al.*, 1985; FOURTILLAN *et al.*, 1989; ESCUDERO *et al.*, 1994).

La oxitetraciclina (como casi todas las tetraciclinas) después de la administración oral se absorbe en el estómago y al comienzo del intestino delgado, observándose una biodisponibilidad $\geq 70\%$. La absorción disminuye cuando se administra junto con alimentos (sobre todo leche o derivados lácteos). Normalmente tras la administración

oral, se alcanza una concentración plasmática máxima (C_{\max}) entre 1 y 3 horas (T_{\max}) (VICENTE y PEREZ-TRALLERO, 2010).

En un estudio realizado en cerdos, a los que se administró 20 mg/kg de oxitetraciclina por vía intramuscular, se pudo observar que las concentraciones plasmáticas alcanzaron valores de $6,7 \pm 3,4$ $\mu\text{g/ml}$ a los 90 minutos de la inyección. En el mismo estudio, otro grupo de cerdos fue tratado con pienso con tetraciclina pura (0,55 mg/kg de pienso). En este grupo, la concentración plasmática observada, fue de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas (T_{\max}), disminuyendo a las 96 horas a niveles de 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Para comparar los parámetros farmacocinéticos plasmáticos de absorción de la oxitetraciclina en animales domésticos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de absorción de la oxitetraciclina en animales domésticos

Especie	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)	AUC (mg x h /l)	F (%)	Referencias
Conejos	10	IM	3,20	1,25-3	-	71,4	SCHIFFERLI, <i>et al.</i> , 1982
Bovino	10	IV	-	-	61,86	-	TOUTAIN y RAYNAUD, 1983
	10	IM	3,01	4,01	61,78	99,87	
	50	PO	4,99	9,16	-	100	
Bovino	20	IM	4	1	-	51,50	DAVEY <i>et al.</i> , 1985
Bovino	20	IM	6,50	-	166	76,80	HORSPPOOL y McKELLAR, 1990
Equino	10	IV	-	-	155,80	-	PAPICH <i>et al.</i> , 1995
Equino	50	IV	-	-	351,42	-	PIJPERS <i>et al.</i> , 1991b
Porcino	20	IM	6,7	1,5	104,4	-	HALL <i>et al.</i> , 1989
	20	IM-LA	6,0	0,5	101,8	-	
	20	PO ayunas	-	-	-	-	
	0,55mg/kg alimento	PO alimento	-	-	-	-	
Porcino	10	IM	6,70	1,30	104,70	-	NIELSEN Y GYRD-HANSEN, 1996
Porcino	10	IV	-	-	43,44	-	PIJPERS <i>et al.</i> , 1990
	45	PO ayunas	0,7	3,8	6,3	3	
	45	PO alimento	0,4	4,3	5,9	3	
Porcino	10	IV	-	-	46,3	-	MEVIUS <i>et al.</i> , 1986,
	50	IV	-	-	253,2	-	
Porcino	20	IV	-	-	81,2	-	PIJPERS <i>et al.</i> , 1991a
	20	PO ayunas	1,27	3	7,33	9	
	29	PO alimento	0,20	-	3,6	3,69	
Porcino	10	IV	-	-	57,5	-	PIJPERS <i>et al.</i> , 1991b
	50	PO ayunas	1,87	1,74	13,7	-	

C_{max} (Concentración máxima en plasma); **T_{max}** (Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima); **AUC** (Area bajo la curva); **F** (Biodisponibilidad). **PO** (Vía oral, en cerdos, cuando especifica en “ayunas” se administra con agua en los estudios descritos); **IM** (Intramuscular); **IV** (Intravenosa), **LA** (Oxitetraciclina de larga duración)

2.3.2. Distribución

Las tetraciclinas se distribuyen rápidamente por todos los tejidos y líquidos del organismo. El grado de unión a proteínas plásmaticas es variable. El grado de unión depende de la tetraciclina, por ejemplo, la doxiciclina, se une a proteínas entre un 80 y un 95%; mientras que para la demeclociclina es del 65 al 90% y un 80% para la metaciclina; la minociclina se une en un 75%; la tetraciclina en un 65%, y la oxitetraciclina entre un 20 y un 40% (MERLE *et al.*, 1991).

Las tetraciclinas se concentran en el hígado, y se excretan por vía biliar. La concentración de las tetraciclinas en la bilis es de 5 a 10 veces superior a la concentración plasmática (incluyendo a la clortetraciclina y la oxitetraciclina), mientras que para la demeclociclina, la doxiciclina y la minociclina las concentraciones biliares son entre 10 y 30 veces superiores a las concentraciones plasmáticas. Tras la excreción biliar, las tetraciclinas sufren procesos de reabsorción enterohepática (BARRIGON *et al.*, 1993).

Las tetraciclinas tienen tendencia a depositarse en los huesos y dientes, donde forman quelatos. Este efecto se evidencia más cuanto mayor duración tenga el tratamiento, aunque también existe una capacidad individual para formar quelatos más o menos estables (GROSSMAN *et al.*, 1971).

La oxitetraciclina atraviesa sin mucha dificultad pero en pequeña cantidad la barrera hematoencefálica (HUNT *et al.* 1953). Su penetración en otros líquidos corporales y tejidos es excelente; por ejemplo, tras la administración sistémica de tetraciclinas se alcanzan concentraciones en la pared y lumen uterinos (tanto en úteros sanos como enfermos) que son similares a las concentraciones plasmáticas. Incluso al administrar dos dosis de 10 mg/kg de tetraciclina por vía intramuscular se alcanzan concentraciones superiores a las CMI de la mayor parte de los microorganismos sensibles a estos fármacos (BRETZLAFF *et al.*, 1982; 1983).

2.3.3. Metabolismo y eliminación

Las tetraciclinas se metabolizan en el hígado en diferente medida (dependiendo de la tetraciclina de que se trate). No obstante, en la mayoría de los casos, el compuesto detectado con más frecuencia en heces, orina y tejidos es la tetraciclina inalterada, y el

grado de biotransformación es mínimo. Existe un epímero, que es la 4-epioxitetraciclina, que no puede considerarse metabolito ya que la oxitetraciclina no sufre biotransformación y es un producto de degradación que proviene de la formulación de la oxitetraciclina.

La eliminación de las tetraciclinas es fundamentalmente por vía renal (filtración glomerular), y en menor medida por la bilis. El estado de la función renal afecta de forma significativa la excreción, ya que la depuración renal de estos fármacos se realiza por filtración glomerular (KUNIN, 1967). La minociclina se recupera en orina y heces considerablemente metabolizada y en cantidades significativamente menores a otras tetraciclinas. El fármaco persiste en el organismo después de su administración, por su retención en el tejido adiposo. También se excretan en la leche materna, siendo el nivel aproximadamente la mitad que el plasmático. La difusión a través de la barrera hematomamaria se realiza mediante un mecanismo de transporte pasivo dependiente del pH que determinará la fracción no ionizada así como la solubilidad en lípidos lácteos. La concentración alcanzada en la leche es superior para tetraciclina que para oxitetraciclina. La vía intramamaria se utiliza en ganado vacuno de leche, donde se ha demostrado que existe difusión de oxitetraciclina (BLOBEL y BURCH, 1960; ZIV y SULMAN, 1974)

En general, los estudios realizados muestran diferencias significativas entre especies en la semivida plasmática de eliminación de la oxitetraciclina, por ejemplo tras la administración de oxitetraciclina por vía intravenosa, algunos autores observaron una semivida de eliminación entre 6,4 y 11,8 horas en terneros de 1 a 3 meses de edad (SCHIFFERLI *et al.*, 1982, AMES *et al.*, 1983; NOUWS y VREE, 1983; BURROWS *et al.*, 1987) 9 horas en vacas (YODER y PACKER, 1954; PILLOUD, 1973), 10 horas en caballos (PILLOUD, 1973), 2,8 a 3,8 horas en cerdos jóvenes (MERCER *et al.*, 1978; XIA *et al.*, 1983; MEVIUS *et al.*, 1986), 3,8 horas en cabras (ELSHEIKH *et al.*, 1997) y de 6,3 horas en ovejas (ELSHEIKH *et al.*, 1997). Tras su administración por vía intramuscular, la semivida de eliminación fue de 15 horas en terneros (AMES *et al.*, 1983; NOWUS Y VREE, 1983; BANTING *et al.*, 1985), de 11 horas en vacas lecheras y de 10 horas en cerdos (BANTING y BAGGOT, 1996).

Las diferencias en la semivida de eliminación, se deben a factores como la vía de administración utilizada, formulación, especie animal y edad de los animales tratados..

MEIJER *et al.*, (1993) observaron una semivida de eliminación muy prolongada en vacas al administrar oxitetraciclina por vía intramuscular e intravenosa. Estos autores concluyeron que la lenta eliminación de la oxitetraciclina podía atribuirse probablemente a la liberación de oxitetraciclina desde el tejido óseo donde se acumula.

En la **Tabla 4** se muestran los parámetros farmacocinéticos de la oxitetraciclina en distintas especies.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de distribución y eliminación de la oxitetraciclina en distintas especies domésticas

Especie	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	Vd (área) (l/kg)	Vss (l/kg)	Cl (l/kg/h)	Referencias
Caprino	10	IV	-	6,28	1,44	-	0,156	ESCUADERO <i>et al.</i> , 1994
	10	IM	-	10,38	-	-	-	
	20	IV	-	6,03	-	-	-	
	20	IM	-	29	-	-	-	
Conejos	10	IV	0,06	1,32	0,861	0,66	0,434	McELROY <i>et al.</i> , 1987
Bovino	20	IV	0,48	9,24	-	-	-	ZIV y SULMAN, 1974
Bovino	22	IV	1,03	6,5	0,53	-	-	BRETZLAFF <i>et al.</i> , 1982
Bovino	11	IM	-	10	-	-	-	BLACK, 1982
Bovino	10	IV	0,38	7,16	2,84	1,55	0,16	SCHIFFERLI, 1982
	10	IM	1,52	9,83	-	-	-	
	50	PO	4,43	10,66	-	-	-	
Bovino	11	IV	1,60	11,80	3,33	2,32	0,201	AMES <i>et al.</i> , 1983
Bovino	11	IV	1,20	14,70	4,99	3,602	0,241	
Bovino	20	IV	0,22	9,04	0,868	-	-	TOUTAIN y RAINAUD, 1983
Equino	2.5	IV	-	10,5	-	-	-	TESKE <i>et al.</i> , 1973
Equino	10	IV	0,96	14,94	1,04	0,46	0,06	HORSPOL y McKELLAR, 1990
Equino	10	IV	0,66	7,30	2,19	2,17	0,19	PAPICH <i>et al.</i> , 1995

Especie	Dosis (mg/kg)	Via de administración	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	Vd (área) (l/kg)	Vss (l/kg)	Cl (l/kg/h)	Referencias
Porcino	11	IV	-	3,87	1,26	-	0,183	MERCER <i>et al.</i> , 1978
Porcino	10	IV	-	6,5	-	1,4	0,22	NIELSEN y GYRD-HANSEN <i>et al.</i> , 1996
	45	PO en ayuno	-	10,3	-	-	-	
	45	PO en pienso	-	11,5	-	-	-	
Porcino	10	IV	0,49	5,86	1,84	-	0,281	PIJPERS <i>et al.</i> , 1990
	50	IV	0,75	6,21	1,78	-	0,202	
Porcino	10	IV	0,46	5,99	1,49	-	0,173	PIJPERS <i>et al.</i> , 1991a
	50	PO en ayuno	2,86	5,92	1,44	-	0,0030	
Ovino	20	IV	0,38	6,77	1,045	-	0,06	DROUMEV <i>et al.</i> , 1992
	70	PO	8,87	22,48	-	-	-	
Terneros	22	IV	-	9,12	-	-	-	PILLOUD, 1973

$t_{1/2\alpha}$ (Semivida de distribución); $t_{1/2\beta}$ (Semivida de eliminación); Vd (Volumen de distribución); Vss (Volumen de distribución en estado estacionario); Cl (Aclaramiento plasmático); PO (Vía oral, en cerdos, cuando específica en “ayunas” se administra con agua en los estudios descritos); IM (Intramuscular); IV (Intravenosa).

2.4. Toxicidad y reacciones adversas

Las tetraciclinas son generalmente irritantes, y es este carácter al que se atribuyen muchas de sus reacciones adversas. Por ejemplo: si se administra por vía oral puede provocar vómitos, y si se administra por vía parenteral puede producir lesiones tisulares. La oxitetraciclina es extremadamente irritante en tejidos, aunque esto puede variar dependiendo de la especialidad farmacéutica. En general se puede afirmar que cuanto más irritante es un preparado, menor es la biodisponibilidad del fármaco, y mayor será el tiempo que permanece en el lugar de la inyección (NOUWS y VREE, 1983).

También las tetraciclinas tienen capacidad de modificar la flora intestinal, ocasionando diarreas y gastroenteritis. También pueden formar quelatos con el calcio, por lo que puede ocasionar efectos cardiovasculares, formación de depósitos en los dientes, en los huesos y en otros órganos como hígado y el riñón (COHLAN *et al.*, 1963; OWEN, 1963).

Las reacciones adversas cutáneas pueden ser: erupciones cutáneas, urticaria, y dermatitis exfoliativa generalizada. La mayor expresión de reacción alérgica es el

angioedema y la anafilaxia. También pueden desarrollarse reacciones de hipersensibilidad en algunos individuos, como irritación ocular, y glositis hipertrófica o atrófica. La dimeclociclina, doxiciclina, y otros derivados pueden producir reacciones de hipersensibilidad leves o graves de la piel en personas tratadas y expuestas a la luz solar (KAPUSNIK-UNER *et al.*, 1996).

En ganado vacuno se ha observado que la administración de dosis elevadas de tetraciclinas (33 mg/kg por vía IV o superiores) causa esteatosis hepática (infiltración de grasa en el hígado) y necrosis grave de los túbulos renales proximales (GRIFFIN, 1979; LAIRMORE *et al.*, 1984). Se han reportado en ovinos efectos cardiovasculares cuando la administración de la tetraciclina se efectúa por vía intravenosa rápida. Además el 20% de los preparados de acción prolongada provocan un aumento de la acción irritante del principio activo. Por otra parte, en caballos, al administrar tetraciclinas por vía oral, puede producir una supresión de la microflora propia del animal, dando lugar al crecimiento de algunas cepas de *Salmonella* resistentes a las tetraciclinas o de otros patógenos, por lo que pueden aparecer graves diarreas (PRESCOTT y BAGOTT, 2000).

En cuanto a toxicidad cardiovascular, los efectos tóxicos observados, suelen ser dosis-dependiente y también dependiendo de la frecuencia de su administración. Por vía intravenosa rápida, se puede producir el síndrome del colapso agudo, así como arritmias cardíacas graves, trastornos de la conducción, hipotensión y efecto inotrópico negativo (GYRD-HANSEN *et al.*, 1981). El efecto inotrópico negativo puede ser neutralizado si se administra cloruro cálcico antes de administración del antibiótico y si la infusión intravenosa se realiza lentamente (al menos durante cinco minutos).

A nivel gastrointestinal las tetraciclinas al ser administradas por vía oral, pueden originar una irritación directa sobre la mucosa digestiva. Estos efectos pueden ser consecuencia de la acción directa de los quelatos formados por tetraciclinas con iones metálicos di y trivalentes sobre la mucosa gástrica e intestinal (LIEBER y LEFEBVRE, 1959). El tratamiento oral prolongado con dosis altas de tetraciclinas en terneras (33 mg/kg) puede ocasionar una sobreinfección en el abomaso. También se han descrito úlceras esofágicas al ingerir tetraciclinas con poco volumen de agua (CROWSON *et al.*, 1976).

Se han observado también lesiones hepáticas (degeneración grasa aguda) (DOWLING y LEPPER, 1964) y necrosis renal a nivel de los tubulos proximales cuando se usan tetraciclinas en el tratamiento de enfermedades respiratorias en ganado vacuno de engorde (STEVENSON, 1980; VAALA *et al.*, 1987).

Además, las tetraciclinas pueden agravar la uremia en animales con nefropatías mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas. También inducen el metabolismo de aminoácidos, provocando uremia (SHILS, 1963).

De todas las tetraciclinas, la oxitetraciclina y la doxiciclina son los antibióticos menos hepatotóxicos. La mayoría de los casos de toxicidad hepática se han observado en humanos que recibían 2 g/día de fármaco por vía parenteral, aunque también se han observado después de la administración oral de dosis elevadas.

Además en cerdos se han observado las siguientes reacciones adversas a la oxitetraciclina: inflamación en el lugar de inyección, agitación, ataxia, temblores, inflamación de los párpados, orejas, hocico, ano y vulva (o escroto en el verraco), anomalías respiratorias (como un aumento del esfuerzo respiratorio), hipersalivación, colapso y muerte. Algunas de estas reacciones pueden ser debidas a anafilaxis o colapso cardiovascular de causa desconocida (NORBROOK LABORATORIES, 2015).

2.5. Indicaciones terapéuticas

Las infecciones bacterianas más frecuentes en el cerdo se pueden categorizar en tres grupos: infecciones entéricas y respiratorias.

Dentro de las infecciones entéricas destacan las infecciones por *Escherichia coli* (diarrea del lechón, diarrea neonatal y diarrea post-destete), que suelen ser resistentes a las tetraciclinas (y se tratan mejor con polimixina u otros antibióticos, preferiblemente dependiendo de los resultados del cultivo. *Clostridium perfringens* (Tipo C: enteritis necrótica; Tipo A: diarrea); *Clostridium difficile* (diarreas), donde la oxitetraciclina puede ser eficaz observándose solo un 25% de resistencias, lo que contrasta con el 78% de resistencias en granjas de cerdos donde se añade al alimento (POST y SONGER, 2004). *Salmonella* spp (*Tiphimurium*: diarrea ocasional, septicemia y muerte; *Derby*: diarrea ocasional; *Choleraesuis*: septicemia, diarrea, muerte), al igual que con *E. coli* es bastante resistente a las tetraciclinas, y también debe basarse en la experiencia local o en

pruebas de susceptibilidad (MADSON, 2008); *Lawsonia intracelullaris* (ileitis porcina proliferativa, ileitis regional necrótica, enteropatía porcina hemorrágica) se trata de forma muy efectiva con tetraciclinas; no obstante WATTANAPHANSAK *et al.*, 2007 mostró un valor de CMI elevado para la clortetraciclina (lo que significa que podrían desarrollarse resistencias); y en *Brachyspira hyodysenteriae* (disentería porcina); *Brachyspira pilosicoli* (espiroquetosis intestinal, colitis), siempre se deben realizar pruebas de susceptibilidad debido a las resistencias encontradas (pudiendo llegar a erradicarse con un adecuado control).

En cuanto a las infecciones bacterianas respiratorias destacan las producidas por los siguientes microorganismos: *Pasteurella multocida* (rinitis atrófica); es predeciblemente susceptible a tetraciclinas y también a otros antibióticos como penicilinas, ceftiofur, gentamicina, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfamidas/trimetoprim y florfenicol (YOSHIMURA *et al.*, 2001; LIZARAZO *et al.*, 2006; WALLMANN, 2006); *Bordetella bronchiseptica*, suele ser bastante sensibles, hasta ahora, a las tetraciclinas; y también a ampicilinas, cloranfenicol y sulfonamidas (KADLEC *et al.*, 2004); *Mycoplasma hyopneumoniae* (neumonía enzoótica); puede ser susceptible a la oxitetraciclina pero también se han desarrollado resistencias al igual que ocurre con las fluoroquinolonas y macrólidos; sin embargo es siempre sensible a la tiamulina (AARESTRUP y KEMPF, 2006) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleuropneumonía necrotizante aguda, con muerte en algunos casos en 24 horas), siempre ha tenido una buena susceptibilidad antimicrobiana a la mayoría de los antibióticos de amplio espectro; pero se han descubierto resistencias a tetraciclinas y otros antibióticos, aunque la mayoría de las bacterias patógenas aisladas son aún susceptibles a fluoroquinolonas, ceftiofur y florfenicol (AARESTRUP *et al.*, 2008).

En cuanto a las infecciones bacterianas sistémicas y otras infecciones, destacan las producidas por: *Escherichia coli* (bacteriemia, artritis, infecciones umbilicales, cistitis y nefritis), que como se señaló anteriormente, suelen ser resistentes a las tetraciclinas; *Streptococcus suis* (meningitis, endocarditis, artritis y peritonitis) aunque de baja morbilidad y mortalidad, es normalmente resistente a las tetraciclinas y a los macrólidos en la mayoría de los estudios, pero ha sido históricamente sensible a las penicilinas, aunque se están observando resistencias en algunos países, llegando a constituir un verdadero problema (AARESTRUP *et al.*, 2008); *Haemophilus parasuis* [Enfermedad de Gläser (poliserositis): artritis, pericarditis, peritonitis] es sensible a las

oxitetraciclinas y a la mayoría de los antibióticos; *Mycoplasma hyosinoviae* (artritis micoplásmica) puede ser susceptible a la oxitetraciclina pero sobre todo a la lincomicina y tiamulina; *Staphylococcus aureus* (bacteriemia, artritis, osteomielitis, mastitis y metritis) suele ser oportunista y ha adquirido importancia en medicina humana y salud pública por el riesgo de contagio a humanos a partir de infecciones en cerdos (MRSA C398)(VAN DUIJKEREN *et al.*, 2007) siendo frecuentemente resistente a las tetraciclinas y otros antibióticos como macrólidos y estreptomicina y frecuentemente sensible a sulfamidas/trimetoprim y fluoroquinolonas (VAN DER WOLF, *et al.*, 2008); *Staphylococcus hyicus* (epidermitis exudativa), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (erisipelas, dermatitis, artritis y endocarditis) pueden ser tratadas con oxitetraciclina, pero se han generado algunas resistencias (YAMAMOTO *et al.*, 2001); son sensibles a la penicilina y el control fundamental es a través de la vacunación.

En general, en cerdos, y dentro de las tetraciclinas, la oxitetraciclina y la clortetraciclina se utilizan para el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*. Mientras que la tetraciclina y la doxiciclina se utilizan más para el tratamiento de infecciones originadas por *H. parasuis* y *L. intracellularis*; y en ocasiones, se han descrito resistencias frente a *E. coli* y *Salmonella spp.*

Para las infecciones susceptibles en cerdos se recomiendan dosis de oxitetraciclina desde 4,4 mg/kg hasta 20 mg/kg, dependiendo de la vía de administración utilizada y la indicación. Por ejemplo para anthrax se administra 4,4 mg/kg IM o IV (KAUFFMAN, 1986); aunque las dosis más habitual en ganado porcino para infecciones susceptibles oscila entre 6 - 11 mg/kg por vía IV o IM, y de 10 - 20 mg/kg por vía oral cada 6 horas (HOWARD, 1986). Otras dosis descritas en la literatura es de 40 mg/kg IM a los 3, 6 y 12 días de edad en lechones para tratar la rinitis atrófica porcina (DEJONG y OOSTERWOUD, 1977).

2.6. Integración de farmacocinética (PK) y farmacodinamia (PD): Índices PK-PD

Para poder establecer una dosis óptima para un antimicrobiano lo ideal es que la terapia antimicrobiana no solo debe proveer una cura clínica, sino además erradicar los micro-organismos patógenos para llegar a alcanzar una cura bacteriológica total. Si esto no se consiguiera, la sub-población de organismos que son menos susceptibles podrían

multiplicarse durante o al final de la terapia, por lo que se establecería una población de organismos con unos valores de CMI aumentados, y por tanto, potencialmente resistentes incluso a concentraciones altas del antimicrobiano. Por tanto, es un hecho reconocido que uno de los objetivos de la terapia, además de optimizar la eficacia, es minimizar las oportunidades que se puedan crear para la selección y desarrollo de organismos resistentes (LEES y SHOJAE ALIABADI, 2002; TOUTAIN *et al.*, 2002; McKELLAR *et al.*, 2004).

Los datos publicados indican que los índices con resultado clínico son insuficientemente sensibles para determinar un régimen de dosis óptimo para una cura bacteriológica. Este criterio es fundamental para estrategias diseñadas para minimizar la selección de organismos resistentes. El uso de PK/PD provee una nueva herramienta para resolver este problema. Modelos a base de pulmones y fibras musculares de roedores han generado índices PK/PD empíricos, que han sido utilizados para predecir la efectividad de la terapia (LEGGET *et al.*, 1991; CRAIGG, 1998).

En antibioterapia, se han utilizado tres índices: el índice AUC/CMI (es decir, el Área bajo la curva/Concentración Mínima Inhibitoria) para quinolonas; el índice C_{max}/CMI (es decir, Concentración máxima/Concentración Mínima Inhibitoria) para aminoglicósidos, y $T > CMI$, que es el tiempo para el que la concentración plasmática excede la CMI para antibióticos betalactámicos. Éstos índices han sido propuestos como los índices PK/PD de eficacia, ya que comprenden un parámetro farmacocinético (AUC, $T > CMI$, C_{max}), junto con un parámetro farmacodinámico (CMI). Por tanto ambos incorporan la susceptibilidad microbiológica y la disposición farmacocinética del antibiótico (SCHENTAG *et al.*, 1985; HYATT *et al.*, 1995).

Cada uno de los tres índices predictivos PK/PD de eficacia *in vivo*, está basado en una concentración plasmática del medicamento no-unido a proteínas y no en una concentración total plasmática o tisular. Puesto que los patógenos de relevancia clínica están normalmente localizados extracelularmente, la biofase para productos antimicrobianos está más frecuentemente presente en el fluido extracelular (SCHENTAG, 1989). Sin embargo, para patógenos intracelulares y cuando hay barrera para la difusión del medicamento (por ejemplo en el sistema nervioso central, en la próstata, ojo y abscesos entre otros), la concentración plasmática puede no ser tan útil para predecir la concentración del antibiótico en el lugar de la infección. Cada uno de los tres índices PK/PD es un marcador sustitutivo de lo que se requiere clínicamente, ya

se llame curación clínica o erradicación bacteriana. La validez clínica de estos marcadores sustitutos está actualmente basada en la evidencia de dos fuentes: datos prospectivos o pruebas clínicas retrospectivas y los vínculos mecanísticos entre los marcadores sustitutos y la erradicación bacteriana, que es el objetivo final de la terapia antibiótica. Cuando se confirma la validez de estos índices sustitutos en medicina veterinaria, se deben establecer los puntos de corte (“breakpoints”). Estos “breakpoints” PK/PD aún no están validados de forma clara en medicina veterinaria. Sin embargo, como los índices reflejan diferencias en la farmacocinética de las especies hospedadoras y los valores de CMI de las distintas especies bacterianas, es probable que los “breakpoints” no difieran demasiado entre las distintas especies animales (CRAIG, 1998). Por tanto, los datos derivados de pruebas clínicas o modelos de infección en animales pueden ser una buena base para el diseño de un régimen de dosificación para nuevos antibacterianos y nuevas especies.

Para que el veterinario pueda mejorar su éxito clínico, debe comprender bien el uso de los antibióticos examinando las relaciones básicas de los distintos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) en comparación con la respuesta clínica.

En cuanto a las infecciones respiratorias porcinas más comunes, hay una relación PK/PD entre la concentración plasmática del antibiótico utilizando el área bajo la curva (AUC) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Con antibióticos bactericidas como la enrofloxacina (fluoroquinolona), donde una relación AUC/CMI >100 pueda ser conseguida, la respuesta clínica será buena. Con los antibióticos bacteriostáticos (en el caso que nos ocupa, como la oxitetraciclina), esta relación parece ser menos clara hasta que se empezó a utilizar la “concentración mínima bactericida” (CMB). Al utilizarse en bacterias del tracto respiratorio, en particular *Actinobacillus pleuropneumoniae*, con aquellos antibióticos que no se concentran excesivamente en el tejido pulmonar (como las fluoroquinolonas y las tetraciclinas), había una predecible relación AUC/CMI en cuanto a la eficacia. Sin embargo, con otros antibióticos como la tilmicosina, tiamulina y tulatromicina que se concentran en el pulmón y en los leucocitos fundamentalmente, no se podía establecer una relación con la concentración plasmática. Por tanto en estos antibióticos, la concentración de antibiótico en los leucocitos es más significativa.

En cuanto a las infecciones entéricas en cerdos, se ha desarrollado un modelo para estimar las concentraciones de un antimicrobiano determinado en el intestino delgado.

Los datos de las concentraciones colónicas (o fecales) de antimicrobianos de este modelo estiman que, aproximadamente, el 29% de las concentraciones colónicas fue utilizado para determinar las concentraciones en el íleo, además del AUC; y un 29% de las concentraciones colónicas para determinar las concentraciones en el yeyuno, además del AUC. Las concentraciones microbianas en el yeyuno corresponden bien a patrones de susceptibilidad de *Escherichia coli* comparando investigaciones y aislados clínicos de CMI. Más recientemente se ha desarrollado una nueva CMI intracelular para *Lawsonia intracellularis*. En ésta se demostró una buena correlación entre las concentraciones del íleo y las AUCs derivadas del modelo y las CMI intracelulares y los patrones de susceptibilidad que han surgido. *Brachyspira hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* también han sido evaluados en relación con las concentraciones del contenido colónico (CCC) y el AUC. El método de determinación de CMI, dependiendo del medio de cultivo, tenía un impacto en el valor de la CMI, siendo la CMI determinada en agar la que mayor correlación guardaba con la CMB. La CCC y la relación AUC/CMI se correlacionaban bien con el resultado clínico, especialmente al utilizarse la proporción de unión a proteínas derivadas del plasma. A pesar de las deficiencias de los datos publicados y la variabilidad en la determinación de la CMI, los principios PK/PD pueden ser aplicados tanto para las enfermedades respiratorias como para las entéricas del cerdo.

Hay un número de aspectos clave dentro de la medicina porcina, que son importantes y específicos. La mayor parte de los antibióticos utilizados en cerdos se administran en el pienso; por tanto, la dosis ingerida va a estar determinada por la cantidad de alimento ingerido por el cerdo. Uno de los mayores problemas al que se enfrenta el veterinario en cuanto a la eficacia, es el de infradosificar. Por ejemplo, si el animal está enfermo o con una temperatura alta, normalmente el animal deja de comer. Además, la edad del cerdo también es importante. La mayor parte de las dosis, están establecidas en base a un cerdo de 20 kg que ingiere 1 kg de alimento por día (o un 5% de su peso). Los cerdos en la fase final de engorde, normalmente se les restringe el alimento para evitar la deposición de grasa, sobre todo en los machos castrados, en los que se puede reducir a la mitad (2,5% en 80 kg o más). Las cerdas lactantes normalmente se les alimenta en un 2,5% de su peso al día, y las secas a tan solo un 1%. Por tanto, para alcanzar una dosis “diana” en cerdas secas para tratar una infección de útero, se debe aumentar cinco veces la cantidad del fármaco en el alimento. La mayor

parte de los antibióticos orales producen unos niveles plasmáticos inferiores a los de la administración parenteral/inyección, especialmente con medicamentos que se metabolizan en el hígado (como los macrólidos y las pleuromutilinas), lo que reduce la biodisponibilidad total. Dentro de las tetraciclinas, dependiendo de la formulación y de la forma de administración (inyección parenteral, o vía oral ya sea en alimento o en agua), hasta ahora se han utilizado las dosis representadas en la **Tabla 5** (BURCH, 2012).

Tabla 5. Tetraciclinas utilizadas en cerdos según las dosis utilizadas (en mg/kg de peso vivo) y la formulación

TETRACICLINA	INYECCIÓN	EN AGUA	EN PIENSO
Oxitetraciclina	10 (L.D. 20-30)	10-30	20
Clortetraciclina		20	10-20
Tetraciclina		20-40	
Doxiciclina	4-6	5	5

L.D.- Larga duración

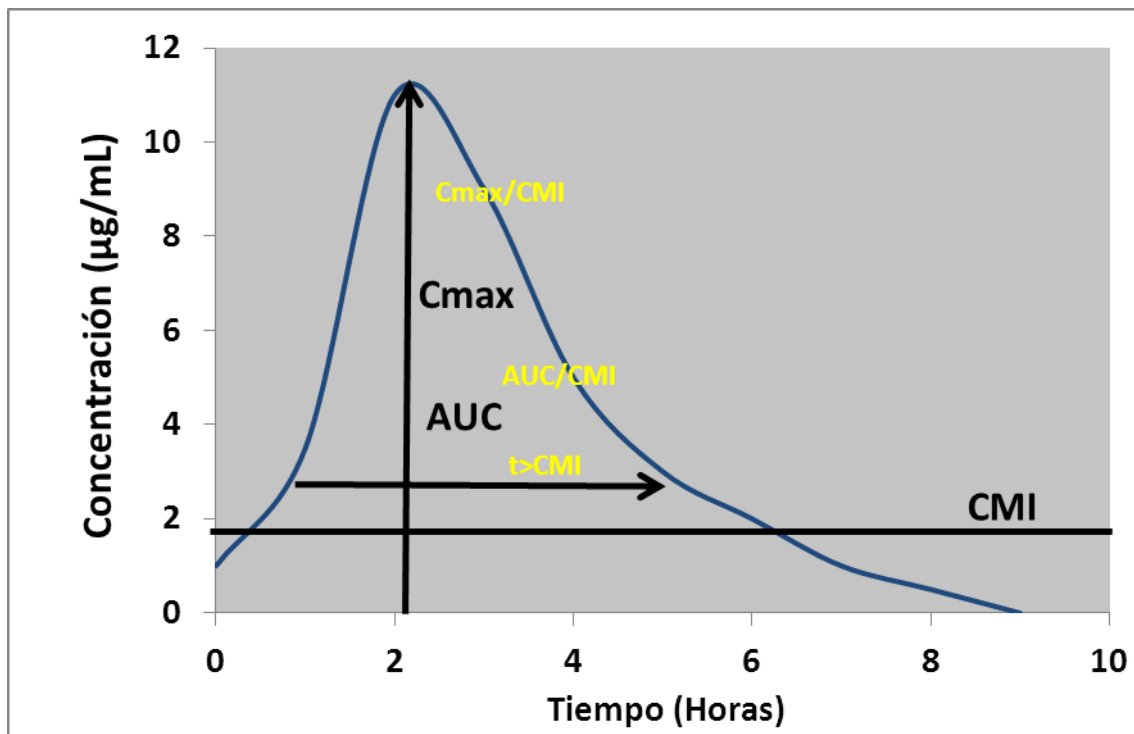
El valor de C_{max} al dividirse por la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico frente a la bacteria patógena, normalmente necesita ser de 10 a 12 para que el antibiótico tenga un efecto bactericida y eliminador. La CMI es la concentración mínima de antibiótico que inhibe el crecimiento de la bacteria cuando se cultiva *in vitro* y se espera que este sea el mismo efecto *in vivo*. Por ejemplo, un producto que alcanza una concentración plasmática (C_{max}) de 6 $\mu\text{g/ml}$, dividida por una CMI de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dará un C_{max}/CMI de 12. La concentración en plasma debe ser de antibiótico libre, no unido a proteínas plasmáticas para que sea preciso; pero este dato no siempre está disponible (BURCH, 2012).

Este concepto es válido para aquellos antibióticos bactericidas donde la razón entre la concentración mínima bactericida/ concentración mínima inhibitoria (CMB/CMI) es cercano a 1. Desafortunadamente, la mayoría de los antibióticos que se utilizan en medicina porcina son bacteriostáticos, y la razón CMB/CMI es mayor de 1, por lo que sólo se consiguen efectos inhibitorios.

El área bajo la curva durante 24 horas (AUC_{24h}) es otro parámetro útil en la integración PK/PD y comprende una concentración y una función de tiempo o de exposición.

De nuevo, este parámetro es útil para los antimicrobianos bactericidas y el AUC_{24h} dividido por la CMI, da un valor de 100 a 125 horas para que haya eficacia terapéutica (SCHENTAG, 2000; TOUTAIN, 2003; LEES *et al.*, 2006; LEES *et al.*, 2008). La razón AUC/CMI también se puede utilizar para penicilinas y sulfamidas/trimetoprim, que tienen un componente particular de tiempo para ejercer su efecto bactericida y un efecto post-antibiótico (EPA) limitado. El PAE es el tiempo que necesitan las bacterias para volver a crecer una vez que la concentración de antibiótico está por debajo de la concentración mínima inhibitoria y normalmente es cuestión de horas. La razón AUC/CMI puede también aplicarse a antibióticos co-dependientes, que son normalmente antibióticos bacteriostáticos, como las tetraciclinas (y también macrólidos y pleuromutilinas) y tanto el factor tiempo como el factor concentración son determinantes en su efecto bactericida.

Figura 5. Parámetros farmacocinéticos y farmacocinéticos-farmacodinámicos básicos tras la administración de una sola dosis o dosis oral de un antibiótico en agua o comida (ERRECALDE, 2004)



Se observan los **parámetros farmacocinéticos**: concentración máxima (C_{max}), área bajo la curva (AUC), el parámetro farmacodinámico concentración mínima inhibitoria para la cepa estudiada (CMI) y los **parámetros farmacocinético-farmacodinámicos** relación concentración plasmática máxima/concentración mínima inhibitoria (C_{max}/CMI), la relación área bajo la curva/concentración mínima inhibitoria (AUC/CMI) y el tiempo durante el cual las concentraciones de antimicrobiano se encuentran por encima de la CMI ($t > CMI$).

Normalmente, para antibióticos bacteriostáticos, la CMI debe ser re-emplazada por la concentración mínima bactericida (CMB) para llegar a conseguir índices mayores, ya que los ratios CMB/CMI pueden ser sustancialmente superiores a 1-2. Para animales con buen estado inmunológico, y para el hombre la razón bactericida óptima puede ser tan baja como AUC/CMI de 50, mientras que en humanos inmunocomprometidos el índice AUC/CMI se ha aumentado a 200 para obtener el control de mutantes (TAM *et al.*, 2005). La relación AUC/CMI puede ser útil para productos administrados por vía oral tanto en el pienso como en el agua de bebida. Otro parámetro útil es el de la concentración en el estado estacionario (C_{ss}). Tras la ingesta o la bebida del agua medicada, la concentración plasmática es bastante plana comparada con la obtenida por inyección. La C_{ss} puede calcularse dividiendo el AUC_{24h} por 24 y la cifra debe ser entre 4-5 veces la de la CMI para un efecto bactericida o 1 vez para un efecto

bacteriostático. También se ha descubierto que es aplicable a concentraciones antimicrobianas en el intestino; pero la unión a proteínas fecales y el pH pueden tener influencia. Además las tetraciclinas pueden unirse al calcio, reduciendo su biodisponibilidad.

El tiempo de la CMI es importante no solo para los antibióticos como las penicilinas y las cefalosporinas; sino también para determinar el intervalo entre dosis. De nuevo, en medicina porcina, esto no es tan importante en productos administrados por vía oral al cerdo ya sea en el pienso o en el agua, y es a menudo dependiente del sistema utilizado y la frecuencia de alimentación y de bebida. La mayoría de los sistemas de alimentación y de bebida son *ad-libitum*.

El método por el que la concentración de antimicrobiano es determinada también es importante. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC o High Pressure Liquid Chromatography) a menudo junto con Espectrometría de Masas (MS) determina la concentración de una sustancia específica. Sin embargo el sistema debe también tener en cuenta los metabolitos activos de los antibióticos, que también deben ser medidos en plasma. La determinación de las concentraciones de los antibióticos en los lugares de infección (diferentes a las concentraciones plasmáticas) es bastante difícil, por tanto muchas veces se depende de un índice de predicción mediado por la concentración plasmática.

Algunos científicos han intentado calcular las concentraciones tisulares de los antibióticos (como por ejemplo en la mucosa bronquial o en la mucosa del colon; pero generalmente, si el organismo está fuera de la célula o del intestino, es poco probable que sean representativas del efecto antibacteriano. Como ejemplo se puede utilizar el método de microdiálisis descrito por CRONEBERGER *et al.*, (2009) para determinar la concentración de cefpiroma en el líquido extracelular del pulmón y la fracción no unida a proteína en cerdos anestesiados, para determinar de forma más exacta la concentración en el lugar de la infección. Sólo hay datos limitados y normalmente depende de la concentración plasmática.

La farmacodinamia (PD) es la acción del antibiótico en el organismo y normalmente está representado por la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico; la concentración que inhibe el crecimiento bacteriano. Por otro lado, la farmacocinética (PK) refleja la concentración del antibiótico que se alcanza en un tejido

diana, normalmente sangre o plasma durante un tiempo. Este dato tiene limitaciones, ya que no describe necesariamente la concentración a la que se eliminan las bacterias; por lo que se observa mejor la concentración mínima bactericida (CMB).

Hay varias formas de determinar la CMI, la más frecuente es determinarla utilizando diluciones que van dividiendo a la mitad la concentración del antimicrobiano, determinando al final la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento de una bacteria. Esto se realiza normalmente en un sistema de tubos de ensayo, en el que a medida que el organismo crece, aparece turbidez en la solución. Se pueden añadir sustancias marcadoras que pueden indicar un cambio de pH, si el organismo creciera. Si el organismo no crece, el marcador no cambia de color, este método se utiliza más frecuentemente para *Mycoplasma* spp. También se pueden utilizar placas de ágar que contienen el antibacteriano, donde la hemólisis en agar-sangre o la prevención de crecimiento de la colonia pueden ser marcadores útiles.

En laboratorios de diagnóstico, se utiliza el método de Kirby-Bauer para que crezca el organismo utilizando una placa con discos de sensibilidad antimicrobiana con distintas concentraciones específicas del antibiótico en el disco. De esta manera se toma observa si hay crecimiento de la bacteria alrededor del disco o no y también de los diámetros de la zona de inhibición.

También se puede utilizar el método Etest, que consiste en una pequeña porción de papel con concentraciones de antibiótico en aumento. En ella, la inhibición del crecimiento bacteriano coincide con la concentración en el papel e indica la CMI aproximada.

Otro de los factores es la cantidad del inóculo bacteriano utilizado, a mayor cantidad, mayor deberá ser la CMI. Se han establecido métodos estándar por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y suelen dar resultados consistentes, pero hay otros factores como la sensibilidad del antimicrobiano al pH y la estabilidad del antimicrobiano en solución (especialmente después de varios días de cultivo como en el caso de la clortetraciclina)

Existen muy pocos datos disponibles de las CMBs para antibióticos bacteriostáticos y muy pocos datos sobre curvas bactericidas, que son concentración y tiempo dependientes y que pueden tener un impacto en la duración del tratamiento.

Las variaciones entre los distintos modos de acción de los antimicrobianos en el intestino y en el tracto respiratorio del cerdo se han establecido, especialmente para antibióticos bacteriostáticos, como las tetraciclinas, macrólidos y pleuromutilinas. La integración de la relación PK/PD con una respuesta clínica o bacteriológica, puede ofrecer una explicación sobre la situación actual y puede utilizarse en el futuro para determinar las dosis óptimas que sirven para el control de las infecciones. Se espera que con una aplicación de estos principios, los antibióticos se utilicen de una forma más eficiente además de observarse una mejora en la respuesta clínica y una posible reducción en el número de resistencias.

Integración PK/PD para infecciones respiratorias del ganado porcino

A pesar del amplio uso de vacunas para la neumonía enzoótica, el agente causal de *M. hyopneumoniae* se encuentra en granjas de cerdos y estudios clínicos demuestran que de un 38 a un 100% de los cerdos tienen lesiones pulmonares en el sacrificio (GUERRERO, 1990). *P. multocida* se aísla frecuentemente con *M. hyopneumoniae* como se ha descrito anteriormente, como bacteria secundaria invasora. *A. pleuropneumoniae* también puede ser primario. Otros microorganismos importantes son *H. parasuis*, responsable de la enfermedad de Glässer, que ocasiona enfermedad respiratoria y bacteriemia con efectos secundarios severos como peritonitis, pericarditis y artritis infecciosa. Este capítulo se ha dividido a su vez en dos secciones.

La neumonía enzoótica es una enfermedad respiratoria crónica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* causando lesiones características en el pulmón en el 40-50% de todos los cerdos sacrificados en matadero. Ocasiona una enfermedad ligera, con tos, menor crecimiento y una baja tasa de mortalidad. En grupos que no han sido nunca expuestos, la neumonía enzoótica puede tener consecuencias más graves. Es frecuente que haya infecciones bacterianas secundarias y víricas; lo que puede dificultar su tratamiento y control. En definitiva, la enfermedad puede dar lugar a un complejo de enfermedades respiratorias porcinas (CRP). Entre las infecciones bacterianas secundarias destaca la *P. multocida*, debido tanto a una disminución del mecanismo de aclaramiento ciliar como a un debilitamiento del sistema inmune. Se ha llegado a demostrar que las co-infecciones por *P. multocida* pueden llegar a doblar en tamaño las lesiones del pulmón (CIPRIAN *et al.*, 1986). La neumonía enzoótica también puede

agravar otras infecciones bacterianas como las causadas por *A. pleuropneumoniae*. Con la propagación de las enfermedades víricas, como el complejo vírico reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y el síndrome del desmedro post-destete (PMWS) asociado con el circovirus porcino tipo 2 (PCV2); se ha observado un aumento de las infecciones bacterianas, particularmente por *H. parasuis* y *S. suis* en las que prácticamente todos los lóbulos pulmonares pueden afectarse.

Para poder establecer unas bases para la evaluación de la eficacia tanto de antibacterianos como de vacunas, se han desarrollado distintos métodos, siendo los más frecuentes la inspección visual y la asignación de una puntuación, que es rápido y relativamente consistente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Comparación de los distintos métodos de puntuación para categorizar las lesiones pulmonares en cerdos.

Lóbulo pulmonar	Máxima puntuación por lóbulo (GOODWIN <i>et al.</i> , 1969)	Sistema porcentual – máxima puntuación por lóbulo	Ajuste porcentual – máxima puntuación basada en el tamaño del lóbulo pulmonar (THACKER <i>et al.</i> , 1988)
Craneal Izqdo. (apical)	10	10	4 (100 x 0,04)
Segmento caudal izquierdo (cardiaco)	10	10	9 (100 x ,09)
Caudal izqdo. (diafragmático)	5	25	25 (100 x 0,25)
Intermedio derecho	5	10	5 (100 x 0,05)
Craneal derecho (apical)	10	10	7 (100 x 0,07)
Medio derecho (cardiaco)	10	10	15 (100 x 0,15)
Caudal dcho. diafragmático)	5	25	35 (100 x 0,35)
Máximo total	55	100	100 (100 x 1)

En las pruebas de eficacia se establecerá una comparación de la reducción porcentual de las lesiones pulmonares entre el control (animales no tratados) y los animales tratados.

La mayoría de los antimicrobianos utilizados en cerdos para tratar infecciones respiratorias, incluídas las pleuromutilinas, macrólidos y fluoroquinolonas, tienen una CMI relativamente baja y un nivel de resistencia bajo (VICCA *et al.*, 2004). En el caso de las tetraciclinas, las CMIs tienden a ser más altas, especialmente para la clortetraciclina en Japón; pero menos para la oxitetraciclina; esto puede ser secundario a su amplio uso durante tantos años.

Las variaciones en la CMI se producen en función del medio utilizado; las placas de agar proporcionan valores superiores que en los medios de cultivo. También la cantidad de inóculo puede aumentar los valores de la CMI. El pH puede también tener un impacto en la CMI. También el punto de corte o (“end point”) puede afectar la CMI si se decide considerar el cambio de color al primer cambio de color o después de un día (por ejemplo) (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de las CMI₅₀, CMI₉₀ y Rango para las distintas tetraciclinas frente a *M. hyopneumoniae*

Antimicrobiano	CMI de la estirpe de referencia	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)	Referencia
Clortetraciclina	12,5 -	12,5 0,39	≥100 1,56	0,78-≥100 <0,024-3,125	INAMOTO <i>et al.</i> , 1994 THONGKAMKOON <i>et al.</i> , 2002
Oxitetraciclina	0,78 0,25 - 0,12	0,78 0,25 0,078 0,12	6,25 1 0,31 1,0	0,1-12,5 0,025-1 0,039-0,63 0,015-0,12	INAMOTO <i>et al.</i> , 1994 HANNAN <i>et al.</i> , 1997 AITKEN <i>et al.</i> , 1999 VICCA <i>et al.</i> , 2004

En la mayoría de los estudios de lesiones de neumonía enzoótica se han utilizado inóculos homogeneizados por vía intranasal (a veces intratraqueal). La infección por neumonía enzoótica a menudo se sobrepone por otra infección bacteriana, a veces por contaminación y otras veces por infección natural. Esta contaminación puede dar lugar a una mala interpretación de los resultados. En los estudios preventivos, la medicación normalmente comienza justo antes o en el momento de la infección, y en los estudios de tratamiento, la medicación normalmente comienza 10-28 días después de la infección, cuando las lesiones han empezado a desarrollarse (BURCH, 2012).

A menudo se puede obtener información farmacocinética de un número de fuentes; pero no siempre está completa. Existe información que correlaciona la concentración de antimicrobiano en plasma con la concentración de antibiótico en el tejido pulmonar para varios antibióticos. La administración de antibióticos en el pienso puede tener un efecto perjudicial en la concentración requeridas en el plasma si la sustancia se metaboliza y se excreta por heces, reduciendo su aparente biodisponibilidad. Muchos compuestos pueden aún detectarse en el pulmón, cuando las concentraciones plasmáticas están por debajo del límite de detección, ya que se concentran en plasma, debido a gradientes de difusión (por ejemplo macrólidos y

pleuromutilinas). Los antibióticos que se excretan fundamentalmente por vía renal, como las tetraciclinas, lincomicina y fluoroquinolonas, normalmente tienen niveles detectables en sangre y en pulmón.

La mayoría de las relaciones PK/PD se han basado en datos de concentración plasmática, C_{max} y AUC y estos valores se dividen por la CMI. Estas relaciones han sido bien descritas por TOUTAIN (2003). Para antibióticos bactericidas como los aminoglicósidos, un valor de 10-12 se ha cuantificado para la relación C_{max}/CMI para administrar una dosis efectiva en una infección. Para fluoroquinolonas, ha sido propuesto un valor AUC/CMI ≥ 100 y < 30 para bacteriostasis. Para antimicrobianos bacteriostáticos, no se han determinado cifras similares. Con la administración en el pienso o agua, la absorción del antibiótico es intermitente y ocurre de forma irregular sobre un período de 24 horas pero la absorción en el tracto gastrointestinal es prolongada. Consecuentemente la concentración en el plasma y en el pulmón es relativamente constante, en comparación con dosis en bolo (ya sea por vía oral o intravenosa). Para las tetraciclinas y macrólidas se establece una relación C_{max}/CMI₉₀ que debe ser mayor a 25. El área bajo la curva (AUC) se calcula por la concentración plasmática o pulmonar durante 24 horas lo que se muestra en la **Tabla 8 y 9** (BURCH, 2012).

Tabla 8. Integración del área bajo la curva durante 24 horas (AUC_{24h}) de distintos antimicrobianos en plasma con el CMI₅₀ y el CMI₉₀ frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* (BURCH, 2012)

Antimicrobiano	Pienso (ppm)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Concentración plasmática (µg/ml)	AUC _{24h} (µg.h/ml)	AUC/CMI ₅₀ (h)	AUC/CMI ₉₀ (h)	Plasma : CMI ₉₀ Índices
Clortetraciclina	550	0,39	1,56	0,25	6	15	4	0,16
Tilmicosina	400	0,1	0,39	0,18	4,32	43	11	0,46
Tilosina	110	0,1	0,25	<0,04	<0,96	9,6	3,8	0,16
Lincomicina	220	0,025	0,1	0,14	3,36	134	33,6	1,4
Enrofloxacin	150	0,025	0,05	0,24	5,76	230	115	5,0

Tabla 9. Integración del área bajo la curva durante 24 horas (AUC_{24h}) de distintos antimicrobianos en pulmón con el CMI₅₀ y el CMI₉₀ frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* (BURCH, 2012)

Antimicrobiano	Pienso (ppm)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Concentración pulmón (µg/ml)	AUC (µg.h/ml)	AUC/CMI ₅₀ (h)	AUC/CMI ₉₀ (h) Índices
Clortetraciclina	550	0,39	1,56	0,55	13,2	34	8
Tiamulina	220	0,04	0,08	1,99	47,76	1194	597
Valnemulina	200	0,0025	0,005	0,23	5,52	2208	1104
Tilosina	110	0,1	0,25	<0,05	1,2	12	5
Tilmicosina	400	0,1	0,39	1,97	47,28	473	121
Tilvalosina	100	0,0125	0,0125	0,14	3,36	269	269
Lincomicina	220	0,025	0,1	1,13	27,12	1085	271
Enrofloxacin	150	0,025	0,05	0,65	15,6	624	312

Es difícil tomar conclusiones de este estudio sobre la pneumonía enzoótica que ha servido de modelo del estudio del índice PK/PD a partir de datos farmacocinéticos y valores de CMI. La elección del medio de cultivo, placa de agar, además del tamaño de inóculo, duración de la incubación después de varios días (como con la clortetraciclina) pueden influir. En algunos casos, por ejemplo, después de la incubación prolongada con tilosina, la CMI continúa subiendo hasta alcanzar valores de “concentración mínima micoplasmicida (CMM=CMB) (GOODWIN, 1979). Por el momento no existe una metodología CLSI estandarizada (Clinical and Laboratory Standards Institute).

El efecto de los antibióticos puede dividirse en tres categorías, bacteriostático, bactericida y eliminación del microorganismo; y esto puede a su vez aut dividirse en prevención y tratamiento. Por ejemplo, las fluoroquinolonas son consideradas como antimicrobianos bactericidas y la eliminación es posible, como se ha demostrado con la fluoroquinolona ofloxacina. Como se describe más adelante las tetraciclinas son tiempo y concentración dependiente. Algunos de los estudios de tratamiento son prácticamente de prevención tardía, empezando a las cuatro semanas post-infección. Se puede conseguir una buena remisión al tratamiento con fluoroquinolonas, como enrofloxacin (92%) en una infección mixta (SIMON *et al.*, 1990); pero se redujo después de un período de observación de 14 días al 79%, lo que sugiere que tiene un efecto bactericida; pero sin conseguir eliminar la infección completamente. Una vez que el tratamiento se haya iniciado, las lesiones desarrolladas pueden alterar los parámetros farmacocinéticos; por ejemplo, concentración en la lesión. Es interesante observar que las pleuromutilinas y tetraciclinas (tiamulina y clortetraciclina 76% y valnemulina y clortetraciclina un 86-93%) proveyó un aumento de las mejorías que simplemente con la clortetraciclina sola (36%). Además, BURCH *et al.* (1986) demostraron una superioridad clínica en el campo combinando la tiamulina y la clortetraciclina frente a *P. multocida*, lo que puede explicar este fenómeno. Relacionar los parámetros farmacocinéticos con efecto clínico, no siempre es tan sencillo. Existe controversia sobre si se debe utilizar los niveles de antimicrobiano en tejido pulmonar o si se debe utilizar el nivel plasmático. *Mycoplasma hyopneumoniae* vive primariamente en la superficie del epitelio bronquiolar; por tanto, la importancia de la concentración pulmonar, que presumiblemente es intracelular en los alveólos, es cuestionable, por lo que las concentraciones plasmáticas pueden ser más significativas. MOUTON *et al.* (2008) opina que el uso de la concentración de antibióticos en tejidos no se justifica, ya

que la mayoría de las infecciones bacterianas son intracelulares, además resulta difícil establecer los niveles de antibióticos en estos compartimentos, a menudo por debajo de los niveles detectables.

En cuanto a la oxitetraciclina en particular hay una serie de referencias que describe la concentración plasmática de oxitetraciclina en cerdos tras su administración en el pienso; pero el trabajo más completo fue realizado por PIJPERS *et al.*, 1991. En este estudio se midieron concentraciones de oxitetraciclina en plasma después de la administración en la comida durante seis días a la concentración de 400, 800, 1600 y 2400 ppm, lo que equivale a una proporción de dosis de 12,1; 26,4; 54,5; 81,5 y 111,3 mg/kg/día respectivamente, utilizando ambos métodos: HPLC y microbiológico, encontrándose cantidades similares por ambos métodos. Las concentraciones máximas de oxitetraciclina fueron 0.22, 0.5, 1.43 y 2.14 µg/ml respectivamente. Las tasas de mejoría clínica oscilaron entre 57-72%. PIJPERS *et al.*, (1994) determinaron las concentraciones plasmáticas y en pulmón tras la administración de oxitetraciclina en el pienso a la concentración de 400, 800, y 1600 ppm (que equivale respectivamente a las dosis de 14, 29 y 60 mg/kg/p.v./día) durante seis días. Los cerdos también fueron infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, como parte de un estudio de infección experimental. En este estudio se determinaron concentraciones superiores en el pulmón comparadas con las del plasma; pero concentraciones ligeramente inferiores que en el primer estudio (**Tabla 10**). La razón concentración pulmonar/ concentración plasmática osciló entre 1,09 – 1,36 :1.

Tabla 10. Concentraciones antimicrobianas en pulmón y en plasma y C_{max} plasma/pulmón (P/L) (BURCH, 2012)

Antibiótico	Formulación	Dosis mg/kg	Cmax Pulmón	Cmax Plasma	Cmax L/P razón	AUC Pulmón	AUC Plasma	AUC L/P razón	Referencia
Enrofloxacin	Iny (24h)	2,5	2,7	0,8	3,4:1	15,5	7,2	2,2:1	SCHEER, 1987 (M)
	Pienso 150ppm	7,5	0,92	0,3	3,1:1	22,1	7,2	3,1:1	Premix brochure data (Anónimo)
Ceftiofur	Iny Na Cef	3		15,8			196		BROWN <i>et al.</i> , 1999 (H)
	Iny Cef HCl (72h)	3		11,8			216		
Tiamulina	Iny. (72h)	15	9,6	0,61	15,7:1	231,5	12,8	18,1:1	McKELLAR <i>et al.</i> , 2004 (M)
	Agua: 60 ppm	6,2	1,1	0,06(E)	Usado 18,1:1				ANDERSON <i>et al.</i> , 1994 (M)
	120 ppm	13,2	4,3	0,24(E)					
	180 ppm	20,9	8,5	0,47(E)					
Pienso: 110ppm	6,6	1,5	0,08(E)					ANDERSON <i>et al.</i> , 1994 (M)	
	220ppm	13,2	2,0	0,11(E)					
						PM/P 4,9-18.2:1			NIELSEN y SZANCER, 1998
Tilosina	Iny. (24h)	10	3,37	3,49	0,96:1	21,3	16,1	1,3:1	HOFFMAN <i>et al.</i> , 1983 (M)
	Pienso: 110ppm	5,5	<0,05	<0,04(E)	Usado 1,3:1				IBAYASHI <i>et al.</i> , 1994 (M)
Tilmicosina	Pienso: 200ppm	10	1,43	<0,1					THOMSON <i>et al.</i> , 1994a (H)
	400ppm	20	2,59	0,23	11,3:1				
	Pienso: 400ppm	20	1,69 MPs 7,2	0,039	43:1 MP/P 184:1				*STOKER <i>et al.</i> , 1996
					MP/P 75:1				BLAIS Y CHAMBERLAND, 1994

Antibiótico	Formulación	Dosis mg/kg	Cmax Pulmón	Cmax Plasma	Cmax L/P razón	AUC Pulmón	AUC Plasma	AUC L/P razón	Referencia
Tulatromicina	Iny: LD 15 días	2,5	3,47	0,62	5,6:1	615	12,0	51,3:1	BENCHAOUI <i>et al.</i> , 2004 (H)
					PM/P 16,6:1 MP/P 8.1:1				EVANS, 2005
Lincomicina	Iny	11	12,5	7,03	1,8:1				*SWENSON y BARBIERS, 1976 (M)
	Pienso: 110ppm 220ppm	5,5 11	0,66 1,13	0,16 0,14	4,1:1 8,1:1				*DeGEETER <i>et al.</i> , 1980 (M)
Oxitetracilina	Iny LD (48h)	20		4,68			86,6		BANTING y BAGGOT, 1996 (M)
	Pienso: 400 ppm	20	0,15	0,11	1,4:1	2,36	2,0	1,2:1	ASANUMA <i>et al.</i> , 1986 (M)
	Pienso: 400ppm 800ppm 1600ppm	20 40 80	0,23 0,42 0,78	0,25 0,57 0,83	1,09:1 1,36:1 1,06:1				PIJPERS <i>et al.</i> , 1994 (M)
	Pienso: 1000ppm	50	0,56	0,44	1,3:1				*JACOBSON <i>et al.</i> , 1994 (M)
Clortetraciclina	Pienso: 400ppm	20	0,66	0,35	1,9:1	11,75	5,78	2:1	ASANUMA <i>et al.</i> , 1986 (M)

(BURCH, 2012). Abreviaturas: Iny (inyección); M (método microbiológico); H (método HPLC); E (estimación); MPs (macrófagos); PMs (polimorfonucleares); P (plasma); L (pulmón); C_{max} (concentración máxima); AUC (Área bajo la curva); LD (Larga duración).

Con los antimicrobianos bacteriostáticos, el tiempo durante el cual la concentración sanguínea excede la CMI es un parámetro importante de eficacia, asumiendo que la CMI es un parámetro *in vitro*. Por tanto, el AUC dividido por 24 horas da el equivalente de un efecto estable sostenido. Para las penicilinas (principalmente tiempo-dependientes), un AUC de 100-120/24h equivale a 4.2-5.0 y normalmente como “regla” se toma que se necesita unas 4 veces la CMI para conseguir un buen efecto bactericida clínico. Con los antimicrobianos bacteriostáticos, un AUC de 24 puede ser considerado inhibitorio (normalmente 1 vez la CMI); pero un efecto inhibitorio o eliminador dependerá de la razón CMB/CMI, lo que varía en función del microorganismo y los antimicrobianos y puede ser bastantes veces superior a uno.

Concentración mínima inhibitoria de distintos antimicrobianos para infecciones respiratorias en cerdos

Normalmente, la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente al microorganismo responsable de la enfermedad es la medida más importante de la actividad antimicrobiana y de su potencial eficacia. Para varios aislados (normalmente superiores a 10) pueden determinarse la CMI₅₀ para una población, la CMI₉₀ y el rango. Esto da una indicación de la susceptibilidad de una población; pero se debe poner en contexto de lo que son las concentraciones de antimicrobiano en plasma o en pulmón o en otro órgano diana, posiblemente en leucocitos y fluidos.

A. pleuropneumoniae:

Existe un alto nivel de susceptibilidad al ceftiofur y también a la enrofloxacin en la mayoría de los trabajos; aunque en Taiwan existe cierto grado de resistencia a la enrofloxacin. Los datos de las CMI de la tiamulina son particularmente variables y se deben a los distintos métodos de cultivo usados, como por ejemplo el medio, la densidad del inóculo y el pH (CASAL *et al.*, 1990; AARESTRUP y JENSEN, 1999, SIDOLI *et al.*, 1984; MATTER *et al.*, 2007). Aparentemente no parece que se estén desarrollando patrones de resistencia (**Tabla 11**).

EVANS (2005) y GODINHO *et al.*, (2005) también describieron una amplia variación de las CMI para la tulatromicina (32µg/ml a 0,25µg/ml), dependiendo del pH, la presencia de CO₂ y suero en el medio.

La susceptibilidad a la tetraciclina es también muy variable. Se han documentado altos niveles de resistencia en Taiwan (CHANG *et al.*, 2002) y en España (GUTIERREZ-MARTIN *et al.*, 2006), probablemente asociado a la utilización de dosis altas de tetraciclina en comparación con Suiza (MATTER *et al.*, 2007) e Italia (SIDOLI *et al.*, 1984) donde los datos tienen más de 20 años de antigüedad.

La tilosina tiene unos valores de CMI altos, especialmente en comparación con las concentraciones alcanzadas en plasma y pulmón en el rango de las dosis clínicas, y de forma similar con la lincomicina. La tilmicosina también tiene unas CMIs altas; pero no existe una CMI comparativa disponible. La eritromicina tiene una CMI de aproximadamente la mitad de la tilmicosina (SHRYOCK *et al.*, 2002).

Tabla 11. CMIs de distintos antimicrobianos frente a *A. pleuropneumoniae*

Antimicrobiano / referencia	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
AARESTRUP y JENSEN, 1999 – Dinamarca – 40 aislamientos (Agar-chocolate)			
Ceftiofur	≤0,03	≤0,03	≤0,03
Enrofloxacina	≤0,03	≤0,03	≤0,03
Tiamulina	4,0	4,0	0,5-4,0
Tilosina	8,0	16	4,0-16
CASALS <i>et al.</i> , 1990 – Dinamarca – 26 aislados (agar-sangre danés)			
Tiamulin	4,0	4,0	1,0-8,0
CHANG <i>et al.</i> , 2002 – Taiwan – 60 aislados (“Veterinary fastidious ágar” – NCCLS)			
Ceftiofur	0,03	0,03	0,03-0,12
Enrofloxacina	0,5	8,0	0,03-16
Lincomicina	16	32	4,0-64
Tetraciclina	8	16	0,25-64
MATTER <i>et al.</i> , 2007 – Suiza – 83 aislados (Veterinary fastidious medium - NCCLS)			
Ceftiofur	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Enrofloxacina	0,03	0,03	0,03-1,0
Tiamulina	16	32	8-64
Tilmicosina	16	16	8-64
Eritromicina	8,0	8,0	4,0-8,0
Tetraciclina	0,5	0,5	0,5-32

Pasteurella multocida:

Existen relativamente pequeños cambios de la susceptibilidad de *Pasteurella multocida* en los últimos 14 años en España, con la excepción de las tetraciclinas, donde parece ser que están apareciendo resistencias. Basándose en las concentraciones alcanzadas después de dosis parenterales, muchos organismos aislados pueden ser susceptibles; pero basándose en las concentraciones conseguidas tras la administración

de antibióticos en el pienso, hay potencialmente un alto riesgo de resistencia a las tetraciclinas (>10%). Las CMI₅₀ para la tiamulina ha disminuído en el mismo período; pero todavía son muy altas (**Tabla 12**).

Tabla 12. CMIs de distintos antimicrobianos frente a *P. multocida*

Antimicrobiano / referencia	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
VERA-LIZARAZO <i>et al.</i> , 2006 – España – 63 aislados (1987-1988)			
Ceftiofur	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Enrofloxacin	≤0,12	≤0,12	≤0,12
Oxitetraciclina	1,0	1,0	≤0,25-16
Clortetraciclina	0,5	1,0	≤0,5-16
Tiamulina	32	32	≤4,0-64
Tilosina	10	20	
Tilmicosina	≤4	≤4	≤4,0-64
VERA-LIZARAZO <i>et al.</i> , 2006 – España – 132 aislados (2003-2004)			
Ceftiofur	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1,0
Enrofloxacin	≤0,12	≤0,12	≤0,12
Oxitetraciclina	2,0	8,0	0,5-16
Clortetraciclina	2,0	8,0	≤0,5-16
Tiamulina	16	32	≤4,0-64
Tilosina	10	20	
Tilmicosina	≤4,0	8,0	≤4,0-16

Haemophilus parasuis:

Las CMI₅₀ Danesas fueron inferiores que las del Reino Unido; pero en España fueron superiores que en el Reino Unido. Los valores de CMI₉₀ para ceftiofur, enrofloxacin, oxitetraciclina, tiamulina y tilmicosina fueron todos superiores en los aislados en España (**Tabla 13**).

Tabla 13. CMI₅₀ de antimicrobianos frente a *H. parasuis*:

Antimicrobiano / referencia	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
AARESTRUP <i>et al.</i> , 2004 – Dinamarca – 52 aislados (“ <i>Veterinary fastidious medium</i> ”, (VFS))			
Ceftiofur	0,03	0,03	0,03
Ciprofloxacina	0,015	0,06	0,015-0,5
Tetraciclina	1,0	2,0	0,06-2,0
Tiamulina	4,0	8,0	1,0-16
Tilmicosina	2,0	2,0	2,0-4,0
MARTIN-DE LA FUENTE <i>et al.</i> , 2007 – Reino Unido – 30 aislados (VFS)			
Ceftiofur	≤0,5	1,0	≤0,5-2,0
Enrofloxacin	≤0,12	0,25	≤0,12-1,0
Oxitetraciclina	0,5	4,0	0,25-16
Tiamulina	≤4,0	16	≤4,0-32
Tilmicosina	≤4,0	8	≤4,0-8,0
MARTIN-DE LA FUENTE <i>et al.</i> , 2007 – España- 30 aislados (VFS)			
Ceftiofur	≤0,5	4,0	≤0,5-16
Enrofloxacin	0,25	4,0	≤0,12-4,0
Oxitetraciclina	2,0	16	0,25-16
Tiamulina	≤4,0	64	≤4,0-64
Tilmicosina	16	64	≤4,0-64

Mycoplasma hyopneumoniae:

Existen algunos incrementos de los valores de la CMI con el tiempo para algunos antimicrobianos; y resistencias a la tilosina, tilmicosina y lincomicina en Bélgica; pero inferiores al 10%. Por comparación, las CMIs para la tiamulina, tilosina, tilmicosina y lincomicina frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* eran bastante inferiores que frente a otras bacterias respiratorias como *A. pleuropneumonia*, *P. multocida* y *Hh parasuis* (Tabla 14).

Tabla 14. CMIs de antimicrobianos frente a *M. hyopneumoniae*

Antimicrobiano/ referencia	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
<i>INAMOTO et al., 1994 – 40 aislados - Japón</i>			
Clortetraciclina	3,1	>100	0,2-≥100
Oxitetraciclina	0,2	3,13	0,025-12,5
Lincomicina	0,025	0,1	≤0,0125-0,39
Tiamulina	≤0,0125	0,025	≤0,0125-0,05
Tilmicosina	0,2	0,39	≤0,0125-0,78
Tilosina	0,025	0,1	≤0,0125-0,2
<i>VICCA et al., 2004 – 21 aislados - Bélgica</i>			
Enrofloxacina	0,03	0,5	0,015->1,0
Doxiciclina	0,12	0,5	0,03-1,0
Oxitetraciclina	0,12	1,0	0,03-2,0
Lincomicina	≤0,06	≤0,06	≤0,06->8,0
Tiamulina	≤0,015	0,12	≤0,015-0,12
Tilmicosina	0,25	0,5	≤0,25->16
Tilosina	0,03	0,06	≤0,015->1,0

Eficacia clínica de la oxitetraciclina frente a las infecciones bacterianas respiratorias

Para establecer las correlaciones de los índices PK/PD con efecto clínico, es importante establecer las CMIs del organismo utilizado en el estudio. Desafortunadamente las CMIs no siempre son conocidas. En la **Tabla 15** se establecen las dosis de oxitetraciclinas indicadas para infecciones respiratorias en cerdos.

La oxitetraciclina ha sido utilizada en numerosos estudios de determinación de dosis. Por ejemplo, en un estudio realizado por PIJPERS *et al.*, (1994), se administraron las siguientes concentraciones (profilácticamente) a cerdos en pienso: 0, 400, 800 y

1600 ppm en el pienso, a los que se les inoculó *A. pleuropneumoniae* con una CMI de 1,0 µg/ml. El porcentaje de cerdos con neumonía fue del 100%, 67%, 27% y 0%, respectivamente; como se indica en la **Tabla 16**. Las CMI de los aislados oscilan entre > 0,5 a 1,0 µg/ml; por lo que el valor de AUC/CMI se aproxima a 24 (18,7 h a 19,9 h) para plasma y para pulmón respectivamente; lo que sugiere que hay muy poca diferencia entre ambos, y que la concentración de 1600 ppm de oxitetraciclina provee una buena protección bacteriostática, como se ha demostrado por la reducción de las lesiones pulmonares (PIJPERS *et al.*, 1991). En un estudio farmacocinético anterior donde la recuperación de la oxitetraciclina fue de 57-72%, utilizando un método HPLC en comparación con las muestras puntuales, por lo que los cálculos de concentración plasmática final, podrían haber sido subestimadas.

Tabla 15. Dosis de oxitetraciclina y clortetraciclina utilizadas en el Reino Unido (Anónimo, 2007). App (*A. pleuropneumoniae*); Pm (*P. multocida*); Bp (*B. bronchiseptica*); G+ (*Gram positivos*); Organismos sensibles (organismos no especificados en registros antiguos). BURCH, 2012.

Antibiótico	Rango de dosis (mg/kg)	Bacteria
Oxitetraciclina		
Inyección	10 / día	Pm, App, Bb
Inyección (LA)	20 / una vez	Pm + organismos sensibles
Agua	10-30 / por 3-5 días	Organismos sensibles
Comida 400-1000ppm	20 / por 15 días	Organismos sensibles
Clortetraciclina		
Agua	20 / por 5 días	Pm, Ss, Bb
Comida 300ppm	10-20 / por 5-7 días	Organismos sensibles

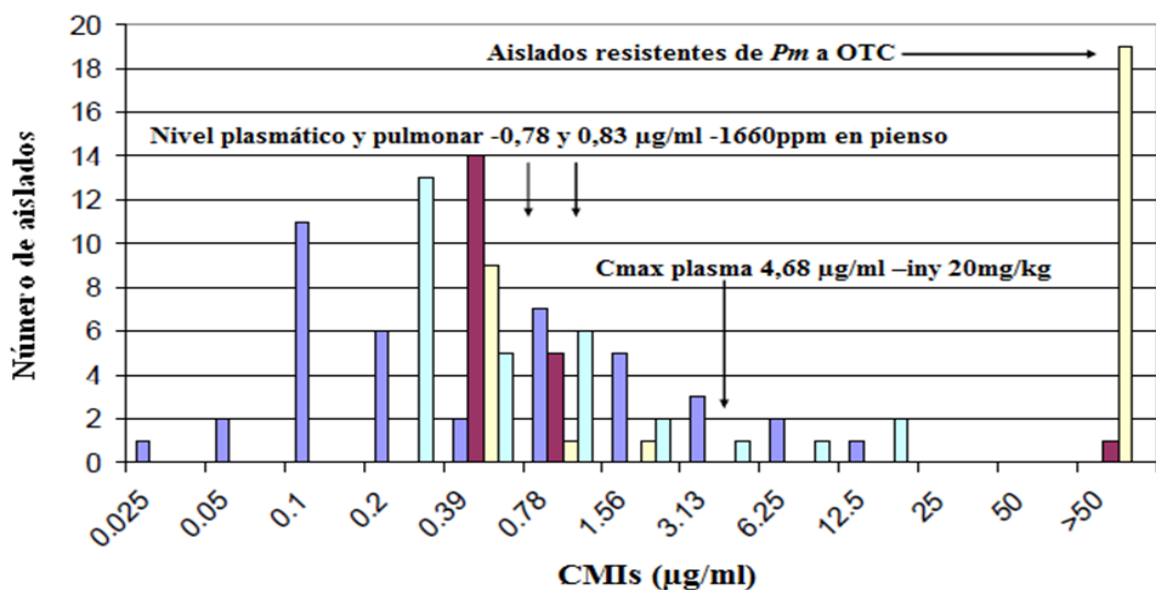
Tabla 16. Relaciones PK/PD en plasma y pulmón de la Oxitetraciclina para la prevención de neumonía por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), PIJPERS *et al.*, 1994.

Tratamiento Oxitetraciclina (ppm)	Cerdos con lesiones por App (%)	CMI (µg/ml)	C _{max} plasma / CMI	C _{max} pulmón / CMI	AUC plasma / CMI (h)	AUC pulmón / CMI (h)
0	100	1,0	0	0	0	0
400	67	1,0	0,23	0,25	5,5	6,0
800	27	1,0	0,42	0,57	10,1	13,7
1600	0	1,0	0,78	0,83	18,7	19,9

En cuanto a las resistencias; existen dos picos de susceptibilidad para *M. hyopneumoniae*, lo que sugiere algún tipo de mutación al nivel aproximado de 0,39 µg/ml, por lo que este valor puede considerarse como el valor de cut-off epidemiológico (ECOV) o “break point”. El siguiente ECOV es aproximadamente de 1,56 µg/ml, que corresponde con el punto de corte las bacterias respiratorias, especialmente *P. multocida*. El ECOV es considerado como el valor normal de la CMI para el micro-organismo antes de la exposición del antibiótico. Cuando existe una verdadera resistencia al antibiótico, el valor de la CMI suele ascender a valores superiores de 50 µg/ml. Como se observa en la **Figura 6**, la concentración plasmática parece ser el parámetro farmacocinético más importante para la oxitetraciclina.

No obstante, BURCH (2012) concluye que al comparar la concentración leucocitaria, pulmonar y plasmática de un antibiótico, junto con su valor cut-off epidemiológico para distintos antibióticos de uso frente a distintas bacterias pulmonares; que para los antimicrobianos que se acumulan en pulmón, la farmacocinética pulmonar puede aún jugar un importante papel como un marcador a la hora de establecer los índices PK/PD y la eficacia clínica frente a infecciones bacterianas respiratorias. El papel de las concentraciones en macrófagos alveolares también parece tener un efecto importante, cuando el antimicrobiano se concentra en éstos a elevadas concentraciones (como es el caso de la tilmicosina y la tiamulina); pero es menos fácil de medir. Se producen dudas sobre los distintos métodos a la hora de determinar las CMIs (PRIDMORE *et al.*, 2011). Por tanto, son necesarios más estudios y clarificaciones antes de probar con toda certeza que el antimicrobiano libre en plasma es una vía de éxito para la mejora de la integración PK/PD.

Figura 6. Patrones de susceptibilidad para la oxitetraciclina frente los patógenos respiratorios más comunes

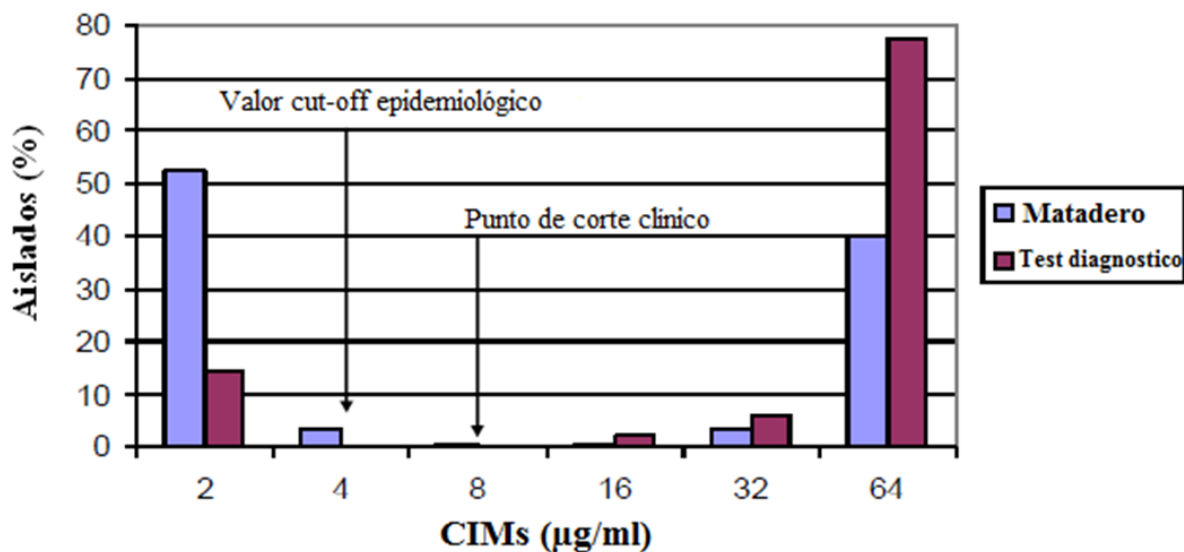


■ *M. hyopneumoniae* (40) ■ *A. pleuropneumoniae* (20) □ *P. multocida* (36) □ *H. parasuis* (30)

(INAMOTO *et al.*, 1994 –*M. hyopneumoniae*; PIJPERS *et al.*, 1994 –*A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*; MARTIN-DE LA FUENTE *et al.*, 2007 –*H. Parasuis*).*Pm* (*Pasteurella multocida*).

En cuanto a la oxitetraciclina para patógenos intestinales, destaca el uso para ciertas diarreas por *E. coli*, HANSEN *et al.*, (2002), registraron la concentración bioactiva de clortetraciclina; primariamente un antibiótico bacteriostático, en las heces del cerdo después de la administración oral en el pienso a 800 ppm. El residuo bioactivo fue de 112 µg/g de clortetraciclina en las heces. La tasa de incorporación normal de la clortetraciclina es normalmente de 300-400 ppm, lo que proveería 42-56 µg/g de clortetraciclina en heces y aproximadamente 13-17 µg/g en contenido del intestino delgado (concentración fecal x 30%, basado en los modelos de CLEMENS *et al.*, 1975 y BURCH 2006), Estas cifras justifican el patrón de susceptibilidad y además el desplazamiento hacia la derecha, lo que puede esperarse después del tratamiento y un aumento de las resistencias.

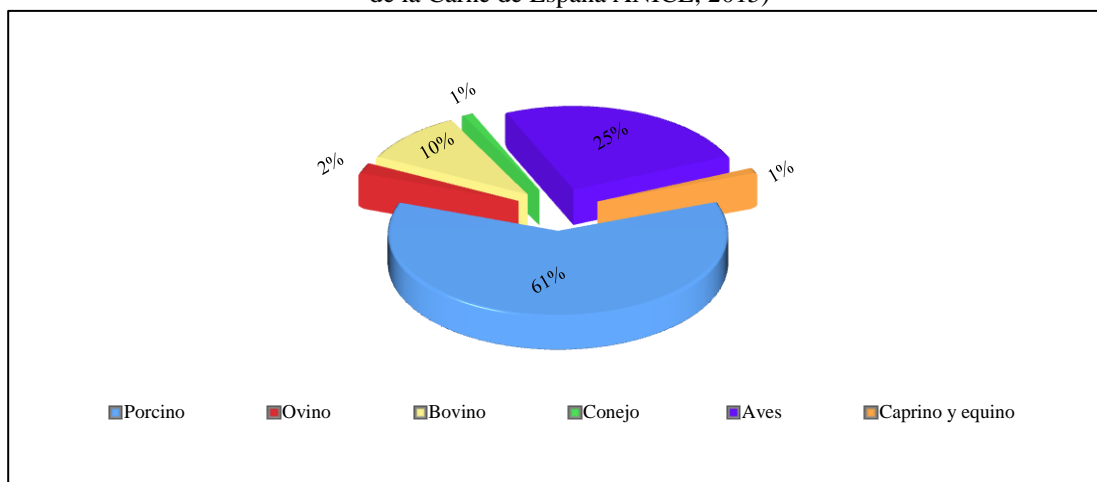
Figura 7. Patrones de CMI de la oxitetraciclina frente a *E. coli* en matadero (n= 208) y ensayos diagnósticos enviados a laboratorio (BURCH, 2012)



2.7. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

El sector porcino es el primer sector ganadero español (**Figura 8**) con una producción anual de más de 4.000 millones de euros, resultados que sitúan a España como el segundo productor de ganado porcino de la Unión Europea.

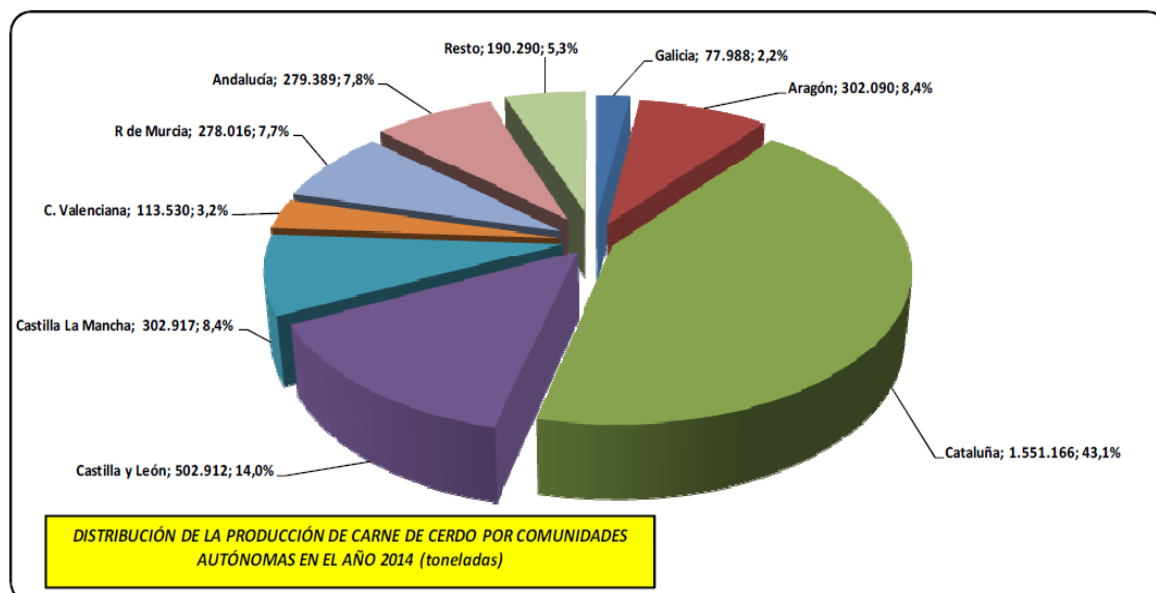
Figura 8. Producción nacional de carne por especies en el año 2014 (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España ANICE, 2015)



La Comunidad Autónoma que más cerdos produce es Cataluña, seguido por las Comunidades Autónomas de Castilla y León, Castilla-La Mancha, Aragón, Andalucía y

Murcia. Más de la mitad de la producción de carne de cerdo en España se localiza en Cataluña y en Castilla y León (**Figura 9**).

Figura 9. S.G. Estadística del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014)



La utilización responsable de antimicrobianos en medicina humana y en medicina veterinaria es uno de los principales ámbitos de la política de la Unión Europea, pertinentes para abordar el problema de la resistencia antimicrobiana. No cabe duda en la necesidad de aplicar acciones para prevenir y reducir la necesidad de utilizar antimicrobianos en producción de ganado porcino que se puedan resumir en (1) fomentar sistemas de producción que proporcionen condiciones ambientales apropiadas para los animales en las explotaciones (2) fomentar la utilización de antibiogramas antes del tratamiento antibiótico, siempre que sea posible; (3) fomentar el desarrollo de determinados programas de vigilancia de enfermedades para identificar y ayudar a prevenir posibles brotes de enfermedades y (4) aplicar medidas concretas para impedir la introducción y propagación de infecciones, tales como fomentar el buen uso de antimicrobianos en base a los datos específicos en cerdos obtenidos a partir de estudios de eficacia y seguridad de los antimicrobianos implicados (CE, 2015)

Para fomentar el buen uso de antimicrobianos se necesita conocimientos de la farmacocinética del agente terapéutico, de forma que su utilización se haga bajo unas bases definidas de eficacia y seguridad. De hecho, la falta de conocimiento de la farmacocinética de un medicamento, puede conllevar que un compuesto

farmacológicamente idóneo, se someta a un régimen terapéutico que no sea racional, y provoque una falta de actividad o ineficacia, o bien dé lugar a una toxicidad adversa inaceptable.

Esta farmacocinética debe de estar integrada con la farmacodinamia a partir de bacterias procedentes de la propia especie animal y que estén implicadas en las indicaciones que se pretenden tratar con la oxitetraciclina.

Desde el punto de vista clínico y toxicológico la farmacocinética es el estudio de los factores que deben considerarse para conseguir niveles de un fármaco óptimos, predecibles, terapéuticamente eficaces y seguros, a partir de la forma de administración del medicamento veterinario.

La oxitetraciclina, antibiótico objeto de nuestro estudio, juega un papel importante por su amplio espectro de actividad antimicrobiana y buena distribución orgánica. Es un antibiótico bacteriostático y co-dependiente, es decir, que su eficacia depende tanto de su concentración como del tiempo. Uno de estos parámetros puede dominar sobre el otro pero ambos son determinantes en la eficacia del antimicrobiano. Teniendo en cuenta las indicaciones terapéuticas de la oxitetraciclina en la especie porcina, se ha hecho imprescindible a efectos de su eficacia el conocimiento previo de la farmacocinética de la oxitetraciclina.

El interés terapéutico de este agente antimicrobiano se basa en tres aspectos fundamentales:

1. La recomendación de uso de antimicrobianos en medicina veterinaria para animales productores de alimentos.
2. El creciente aumento de resistencias frente a antibióticos existentes en el mercado.
3. La escasez de datos científicos sobre farmacocinética en el caso de la oxitetraciclina en cerdos, especie de consumo humano.

En función de todo lo expuesto, la presente memoria tiene por objeto realizar (1) un estudio farmacocinético y (2) el análisis PK/PD en cerdos integrando parámetros cinéticos y farmacológicos, valores de CMI, con el fin de predecir eficacia frente a *Streptococcus suis*, *Clostridium perfringens*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella mellitensis*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella*

multocida, *Campylobacter* spp y *Mycoplasma hyopneumoniae* en el campo de la terapéutica porcina.

Este índice PK/PD es fundamental para realizar posteriormente un estudio clínico para comprobar indicaciones previstas y así fijar un régimen posológico óptimo para una eficacia y seguridad de la oxitetraciclina.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 10 cerdos (5 machos y 5 hembras) de la raza híbrida comercial: Ladrance - Large White x Pietrain-Duroc de 60 ± 5 kg entre 4,5 y 5 meses de edad, clínicamente sanos. Los animales fueron divididos en 3 grupos. Grupo 1 (4 cerdos) utilizados para investigar la cinética plasmática de oxitetraciclina tras la administración única de 5 mg/kg p.c; Grupo 1 (4 cerdos) utilizados para investigar la cinética plasmática de oxitetraciclina tras la administración única de 5 mg/kg p.c; Grupo 2 (4 cerdos) utilizados para investigar la cinética plasmática de oxitetraciclina tras la administración múltiple de 30 mg/kg p.c durante 7 días consecutivos; Grupo 3 (2 cerdos) no recibieron tratamiento y se emplearon para recoger plasma blanco para determinar la validación del método analítico elegido.

Los animales seleccionados para este estudio se identificaron mediante un crotal de color en la oreja.

Las muestras sanguíneas para el análisis procedieron de Clinobs S. L. (Banyoles, Gerona), donde se realizó el estudio clínico.

El antibiótico oxitetraciclina administrado a los animales fue oxitetraciclina clorhidrato procedente de Sigma-Aldrich de una pureza $\geq 95\%$.

3.1. Protocolo y diseño experimental

Los animales seleccionados se alojaron en la zona de experimentación de la Granja Experimental Clinobs distribuidos en jaulas individuales habiendo realizado previamente una limpieza exhaustiva de las mismas.

Se inició entonces el periodo de adaptación de 7 días antes del inicio del experimento al objeto de eliminar el factor estrés producido por el cambio de ubicación y transporte, y para que todos los animales empezaran el estudio en idénticas condiciones. Durante este periodo de adaptación, los animales dispusieron de pienso y agua *ad libitum*. En la fase de adaptación, los animales fueron controlados en cuanto al peso inicial y final y la ganancia de peso media diaria.

El pienso consumido durante este periodo fue el pienso estándar completo para cerdos de engorde comercial. Durante este periodo de adaptación no se observó en los cerdos ningún síntoma de enfermedad.

3.1.1. Estudio farmacocinético de oxitetraciclina tras administración única oral en cerdos

A los animales del Grupo 1 (4 cerdos, 2 machos y 2 hembras) se les administró oralmente vía pienso una dosis de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. Durante el tratamiento, los animales seleccionados siguieron condiciones normales de cría. Se pesó a los animales al inicio del tratamiento. También se hicieron observaciones de control del estado de salud general (aspecto, tonalidad de la piel, erupciones...). En el período de tiempo indicado no se observó en los animales ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión.

Para el tratamiento, los animales fueron alimentados con el mismo pienso basal al que se incorporó la cantidad necesaria de oxitetraciclina para conseguir que cada animal recibiera una dosis de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. Antes de realizar el experimento se verificó la concentración de oxitetraciclina en el pienso medicado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se preparó un pienso medicado, incorporando la cantidad necesaria de oxitetraciclina al pienso basal estándar, de forma que, cada cerdo recibió una dosis exacta de 5 mg de oxitetraciclina/kg p.v. en función de su peso corporal y su consumo medio durante la fase de adaptación. La concentración del pienso administrado fue de 1 g oxitetraciclina/kg pienso. A cada cerdo de 60 kg de peso se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 0,5% del peso vivo medio, es decir, 300 g de pienso medicado, tomando como 60 kg el peso vivo medio, por lo tanto cada animal recibe oralmente 300 mg oxitetraciclina/60 kg p.v. Este pienso medicado se preparó en forma de bolo apetecible y se comprobó que fue consumido en su totalidad. Antes de la administración, los animales se sometieron a un ayuno de 12 horas.

Después del tratamiento y una vez comprobado que todos los animales consumieron el pienso medicado, los animales volvieron a disponer de pienso blanco basal y agua *ad libitum*.

Se eligió para este estudio la dosis de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. para obtener datos farmacocinéticos preliminares de oxitetraciclina que ayudaran a elegir una dosis terapéutica.

Tras el tratamiento, de cada animal se tomaron muestras de sangre (4ml) a diferentes intervalos de tiempo de la vena yugular previa cateterización de la misma y

manteniéndola con un tapón heparinizado para evitar la continua venopunción. Se recogieron muestras de sangre a los 15 y 30 min., 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas tras la administración.

Estas muestras de sangre se recogieron 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 congeló a -45 °C hasta el posterior análisis de la concentración de oxitetraciclina por HPLC.

3.1.2. Estudio farmacocinético de oxitetraciclina tras administración múltiple oral en cerdos

A los animales del Grupo 2 (4 cerdos, 2 machos y 2 hembras) se les administró oralmente vía pienso una dosis de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días consecutivos. Durante el tratamiento, los animales seleccionados siguieron condiciones normales de cría. Se pesó a los animales al inicio y al final del periodo de adaptación (correspondiente al primer día de tratamiento), todos los días de tratamiento y el día antes del sacrificio. También se hicieron observaciones diarias de control del estado de salud general (aspecto, tonalidad de la piel, erupciones...). En el período de tiempo indicado no se observó en los animales ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión.

Para el tratamiento, los animales fueron alimentados con el mismo pienso basal al que se incorporó la cantidad necesaria de oxitetraciclina para conseguir que cada animal recibiera una dosis de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día. Antes de realizar el experimento se verificó la concentración de oxitetraciclina en el pienso medicado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se preparó un pienso medicado, incorporando la cantidad necesaria de oxitetraciclina al pienso basal estándar, de forma que, cada cerdo recibió una dosis exacta de 30 mg de oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en función de su peso corporal y su consumo medio durante la fase de adaptación. La concentración del pienso administrado fue de 6 g oxitetraciclina/kg pienso. A cada cerdo de 60 kg de peso se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 0,5% del peso vivo medio, es decir, 300 g de pienso medicado/día, tomando como 60 kg el peso vivo medio, por lo tanto cada animal recibe oralmente 1,8 g oxitetraciclina/60 kg p.v./día, durante siete días

consecutivos. Este pienso medicado se preparó en forma de bolo apetecible y se comprobó que fue consumido en su totalidad.

Antes de la administración, los animales se sometieron a un ayuno de 12 horas.

Después del tratamiento y una vez comprobado que todos los animales consumieron el pienso medicado, los animales volvieron a disponer de pienso blanco basal y agua *ad libitum*.

Se eligió para el estudio la dosis de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. en base a los datos cinéticos preliminares obtenidos tras la administración de 5 mg/kg, al objeto de obtener datos farmacocinéticos mas apropiados para predecir una eficacia clínica.

Durante el primer día de tratamiento y el último día de tratamiento o séptima administración se recogieron muestras de sangre (4 ml) a los 15, 30 min., 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h, después de la administración de la dosis diaria oral, de manera que la toma de muestra de las 24 h se realizó siempre inmediatamente antes de administrar a las 8 h a.m. la dosis oral diaria del día siguiente.

Durante los días intermedios, días 2, 3, 4, 5 y 6 de tratamiento, se recogieron muestras de sangre (4 ml) a los 30 min., 2, 4, 8 y 24h, de manera que la toma de muestra de sangre de las 24 h se realizó siempre inmediatamente antes de administrar a las 8 h a.m. la dosis oral diaria del día siguiente.

Las muestras de sangre se tomaron a diferentes intervalos de tiempo de la vena yugular previa cateterización de la misma y manteniéndola con un tapón heparinizado para evitar la continua venopunción. Las muestras de sangre se recogieron 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 congeló a -45 °C hasta el posterior análisis de la concentración de oxitetraciclina por HPLC. La **Tabla 17** expresa el esquema del muestreo de sangre realizado para el estudio farmacocinético tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día, durante 7 días consecutivos.

Tabla 17. Muestreo de sangre realizado para el estudio farmacocinético tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día, durante 7 días consecutivos

DÍA DE MUESTREO	Tiempo de muestreo	Tiempo de muestreo (acumulado)
Día 1 Tratamiento	1ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	0,25 h	0,25 h
	0,50 h	0,50 h
	1 h	1 h
	2 h	2 h
	4 h	4 h
	6 h	6 h
	8 h	8 h
	12 h	12 h
	24 h	24 h
Día 2 Tratamiento	2ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	2 h	26 h
	4 h	28 h
	8 h	32 h
	24 h	48 h
Día 3 Tratamiento	3ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	2 h	50 h
	4 h	52 h
	8 h	56 h
	24 h	72 h
Día 4 Tratamiento	4ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	2 h	74 h
	4 h	76 h
	8 h	80 h
	24 h	96 h
Día 5 Tratamiento	5ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	2 h	98 h
	4 h	100 h
	8 h	104 h
	24 h	120 h
Día 6 Tratamiento	6ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	2 h	122 h
	4 h	124 h
	8 h	128 h
	24 h	144 h
Día 7 Tratamiento	7ª dosis 30 mg oxitetraciclina/kg p.v. vía oral pienso	
	0,50 h	144,5 h
	1 h	145 h
	2 h	146 h
	4 h	148 h
	6 h	150 h
	8 h	152 h
	12 h	156 h
24 h	168 h	

3.2. Método analítico de oxitetraciclina en plasma de cerdos

En la literatura existen numerosos métodos para el análisis de tetraciclinas (KORSRUD Y McNEIL, 1988; CHARM y CHI, 1988; McNEIL *et al.*, 1989; TERHUNE y UPSON, 1989a; CALDERÓN *et al.*, 1994; YOSHIDA y KONDO, 1994; ANDERSON *et al.*, 1995), así como por HPLC (SHARMA y BEVILL, 1978; MOUROT *et al.*, 1980; ONJI *et al.*, 1984; OKA *et al.*, 1985; MOATS, 1986a; MOATS, 1986b; KHAN *et al.*, 1987; MARTÍNEZ y SHIMODA, 1988; KONDO *et al.*, 1989; MULDER y VAN DE LAGEMAAT, 1989; BLANCHFLOWER *et al.*, 1989; HAAGSMA y MENGELERS, 1989; RIOND *et al.*, 1989; THOMAS, 1989; LONG *et al.*, 1990; FLETOURIS *et al.*, 1990; FARRINGTON *et al.*, 1991; KIJAT *et al.*, 1991; KRAMER-HORACZYNSKA, 1991; HASSELBERGER, 1991; CARLSSON y BJORCK, 1992; UENO *et al.*, 1992; BRYAN *et al.*, 1992; WALSH *et al.*, 1992; AGASOSTER, 1992; IWAKI *et al.*, 1992; BARKER y WALKER, 1992; WHITE *et al.*, 1993; CROUBELS *et al.*, 1994; TSAI y KONDO, 1994; SONG *et al.*, 1994; YOSHIDA y KONDO, 1994; SOKOL y MATISOVA, 1994; McCracken *et al.*, 1995, MALVISI *et al.*, 1996; BERMÚDEZ-ALMADA *et al.*, 1999; SUNDERLAND *et al.*, 2003; SALEHZADEH *et al.*, 2006; FRITZ y ZUO, 2007; KOWALSKI y POMORSKA, 2007; SHAHID *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2009 y ZHOU *et al.*, 2009) y por HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) (ZURHELLE *et al.*, 2000; LYKKEBERG *et al.*, 2004; DE RUYCK *et al.*, 2007; CETINKAYA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2012; CHIESA *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio, tras estudiar los métodos disponibles para la cuantificación de oxitetraciclina y en función de su sensibilidad y reproducibilidad, seleccionamos para nuestro trabajo el método descrito por WALSH *et al.*, (1992) e IKAI *et al.* (1987). Se realizó el análisis de oxitetraciclina en muestras plasmáticas siguiendo el método descrito por WALSH *et al.* (1992) e IKAI *et al.* (1987), con algunas modificaciones introducidas por nosotros en el proceso de extracción. El ensayo demostró ser un método que cumple con los criterios de validación especificidad, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión y sensibilidad (EMEA, 1998).

3.2.1. Procedimiento de extracción de oxitetraciclina. Condiciones cromatográficas

El procedimiento de extracción de oxitetraciclina en plasma descrito por WALSH *et al.* (1992) llevado a cabo con modificaciones introducidas en nuestro laboratorio fue el siguiente:

Se tomó cada muestra de plasma y se midió el volumen de plasma de cada una de ellas a las que se les adicionó 1,5 ml de buffer EDTA-MacIlvaine pH 4. Tras su mezcla se sometió a una agitación suave mediante un agitador Heidolph Reax 2000 durante 5 minutos. Se centrifugó a 3000 r.p.m. en centrífuga refrigerada (4 °C) Sorwall, modelo RC-5B, durante 10 minutos. A continuación se separó y se recogió el sobrenadante que se situó en cartuchos Bond-Elut, C18, (6cc/g) previamente acondicionados con 5 ml de metanol, 5 ml de buffer EDTA-MacIlvaine pH 4 y 5 ml de agua ultrapura Milli-Q desechando los eluyentes. Los cartuchos se situaron en un sistema de filtración Vac-Elut, Analytical Internacional, conectado a una bomba de extracción Heron. Una vez los cartuchos fueron acondicionados, se filtró el sobrenadante obtenido de la centrifugación y la oxitetraciclina se eluyó a una velocidad no mayor de 10 ml/min, con 1 ml de una mezcla de acetonitrilo y buffer EDTA-MacIlvaine (50:50). El eluyente se recogió en viales de vidrio topacio y una alícuota de 50 µl se inyectó en el sistema cromatográfico de HPLC para el análisis de oxitetraciclina.

El buffer EDTA-MacIlvaine pH 4 se preparó disolviendo 15 g de fosfato disódico dihidratado, 13 g de ácido cítrico monohidratado y 3,72 g de EDTA en un litro de agua ultrapura Milli-Q.

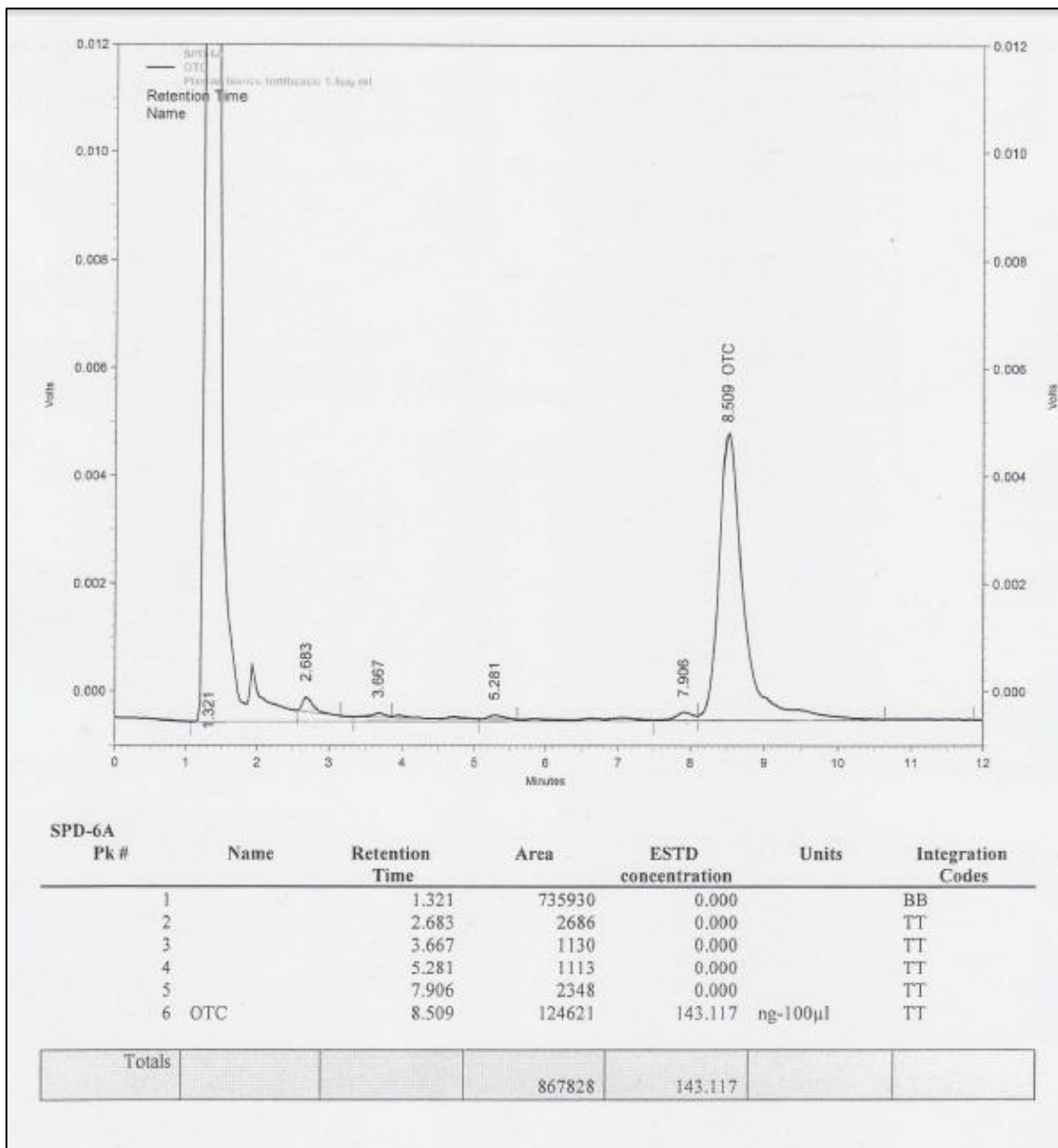
El sistema cromatográfico HPLC utilizado fue un Shimadzu modelo LC-10AD, equipado con detector ultravioleta diodo-array Shimadzu modelo SPD-M10A, dos sistemas de bombeo Shimadzu modelo LC-10AD, autoinyector Shimadzu modelo SIL-10AD y un procesador para el tratamiento de datos Class-VP software. El detector ultravioleta se fijó a una longitud de onda de 350 nm. La columna utilizada fue de fase reversa, Teknokroma, Nucleosil 120 C18 (5 µm; 12,5 x 0,4 cm), equipada con una precolumna Teknokroma TR-C-160-1. El flujo se mantuvo a una velocidad de 1 ml/min.

La fase móvil consistió en una mezcla de ácido oxálico 0,01M–acetonitrilo–metanol en una proporción de 855:120:25 (vol/vol).

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 oxitetraciclina. La solución stock de los estándar de referencia se preparó disolviendo 10 mg de oxitetraciclina en 10 ml de ácido clorhídrico 0,01M y almacenando en la oscuridad a - 45° C. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente a partir de estas soluciones stock diluidas en buffer EDTA-MacIlvaine a pH 4, obteniendo soluciones de trabajo con concentraciones entre 0,050 µg/ml a 60 µg/ml.

Los resultados de la validación del método fueron los siguientes: las curvas de calibrado para la oxitetraciclina fueron lineales en un rango de 0,050-60 µg/ml, el coeficiente de correlación R fue de 0,9999. El límite de cuantificación fue 0,050 µg/ml. La recuperación media de oxitetraciclina en plasma fue > 84%. La precisión intra-día e inter-día presentó 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 método utilizado fue específico para la sustancia analizada y no se observó en el cromatograma (**Figura 10**) ninguna interferencia con las sustancias endógenas propias de los fluidos y tejidos estudiados.

Figura 10. Cromatograma de una muestra de plasma blanco enriquecido con 1500 ng/ml de oxitetraciclina, 1ml de plasma se enriquecen con 1 ml de 1500 ng/ml de oxitetraciclina y se extraen en un volumen final de 1 ml (1500 ng/ml). El volumen de inyección es 100 μ l (143.117 ng/100 μ l).



3.2.2. Validación del método analítico oxitetraciclina en plasma de cerdo

Para la validación de la técnica se ha utilizado el plasma obtenido de la toma de muestras de sangre de 2 cerdos sanos de la raza híbrida comercial: Ladrance - Large White x Pietrain-Duroc de 60 ± 5 kg que no recibieron tratamiento. Se ha llevado a cabo un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para evaluar concentraciones en plasma de cerdo de oxitetraciclina, siguiendo el proceder de WALSH *et al.* (1992) y de IKAI *et al.* (1987) con modificaciones introducidas. El

método utilizado cumple con los criterios de validación linealidad, recuperación, precisión (repetibilidad de la recuperación), exactitud, sensibilidad, especificidad, estabilidad y robustez.

- **Preparación de las soluciones estándar de oxitetraciclina.** Tomamos la medida del factor de pureza pesando exactamente la cantidad requerida de para tener una solución stock de 1 mg/ml. Mediante esta solución stock se preparan diferentes soluciones de oxitetraciclina en rangos de 50 ng/ml-60000 ng/ml (es decir, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 750 ng/ml, 1500 ng/ml, 15000 ng/ml, 25000 ng/ml y 60000 ng/ml de oxitetraciclina.

- **Procedimiento de enriquecimiento y determinación de la recuperación.** La determinación se efectuó en 7 niveles de concentración en plasma: 50 ng/ml, 75 ng/ml, 750 ng/ml, 1500 ng/ml, 15000 ng/ml, 25000 ng/ml y 60000 ng/ml de oxitetraciclina..

Utilizando las soluciones estándar de oxitetraciclina, se procedió por separado al enriquecimiento de las muestras de plasma blanco, individualmente en la forma siguiente: en un tubo de policarbonato se sitúa 1 ml de plasma, se enriquece con 1 ml de la solución correspondiente de oxitetraciclina para obtener la concentración deseada, y a continuación se adiciona 5 ml de buffer-Mc Ilvaine pH 4 para proceder a su homogenizado y seguidamente llevar a cabo el proceso de extracción.

- **Cálculo de resultados y validación del método analítico.** La presencia de oxitetraciclina está supeditada al tiempo de retención del analito en la muestra a estudio en el sistema HPLC, en relación al tiempo de retención de cada uno de estos en la muestra estándar de referencia (método del estándar externo).

- **Soluciones preparadas en el laboratorio**

- a. Solución 0,01 M de ácido clorhídrico: en un matraz aforado de 50 ml añadir agua destilada y desionizada y 44,1 μ l de ácido clorhídrico y finalmente enrasar con agua hasta 50 ml.

- b. Solución 0,01 M de ácido oxálico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): pesar 1,26 g y llevarlo en matraz aforado a 1000 ml con agua destilada y desionizada.

- c. Buffer EDTA-Mc Ilvaine (pH 4): pesar 15 g de sodio fosfato dibásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 13 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 3,72 g de etilen diamino tetra acético disódico

($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), llevarlo a 900 ml con agua destilada y desionizada, y se ajustará la solución a pH 4 con ácido clorhídrico de 35 % de riqueza (aproximadamente se necesita 0,5 ml), para a continuación en matraz aforado enrasar al volumen final de 1000 ml con agua destilada y desionizada.

d. Fase móvil (HPLC): La fase móvil consistió en una mezcla de ácido oxálico 0,01 M, acetonitrilo y metanol en proporción 855:120:25 respectivamente. Se mezcla bien y la solución resultante se desgasifica en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

• **Cuantificación y expresión de los resultados.** La cantidad de oxitetraciclina en la muestra de plasma se determina, utilizando la recta de calibrado correspondiente de plasma blanco fortificado, por la medida de la concentración correspondiente al área del pico en el tiempo de retención:

Oxitetraciclina en la muestra de plasma:

$$C \text{ (ng/g)} = \frac{\text{Área de pico} - a}{b}$$

Siendo

A = área de pico encontrada en el cromatograma del análisis de la solución de la muestra tisular (100 μ l)

a = término independiente de la recta de regresión

b = pendiente de la recta de regresión

(2 g de tejido se extraen finalmente en 2 ml de fase móvil)

(Volumen de inyección 100 μ l)

• **Curva de calibración, linealidad y recuperación.** Curvas de calibración [incluyendo el porcentaje del coeficiente de variación (CV) y tiempo de retención] fueron construidas a partir de concentraciones estándar de oxitetraciclina para los rangos de soluciones estándar de oxitetraciclina de 50 a 60000 ng/ml y para muestras plasmáticas enriquecidas a concentraciones en un rango de 50 a 60000 ng/ml de plasma. La representación de esta curva, concentración en el eje de abscisas y las áreas de los picos en el eje de ordenadas, demuestra que fue lineal. La recta de calibración fue

obtenida por análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación R fue 0,9999 (**Tablas 18 y 19**).

Tabla 18. Linealidad de soluciones estándar de oxitetraciclina

Concentración (ng/100 µl)	Concentración (ng/ml)	Área Valor medio ± DS n = 6	CV	Tiempo de retención (min) Valor medio ± DS
5	50	4553,33 ± 108,25	2,38	8,686 ± 0,155
7,5	75	6711,67 ± 241,10	3,59	8,200 ± 0,100
75	750	66439 ± 2669,40	6,36	8,257 ± 0,232
150	1500	132383,67 ± 3559,16	8,51	8,284 ± 0,204
1500	15000	1316314,17 ± 9253,37	6,20	8,287 ± 0,206
2500	25000	2228573,83 ± 15988,60	3,22	8,208 ± 0,122
6000	60000	5289093 ± 52639,16	2,61	8,136 ± 0,119

TABLA 19. Linealidad del plasma de cerdo fortificado con oxitetraciclina

Concentración (ng/100 µl)	Concentración (ng/ml)	Área Valor medio ± DS n = 6	CV	Tiempo de retención (min) Valor medio ± DS n = 6
5	50	4498,50 ± 151,59	3,37	8,686 ± 0,155
7,5	75	6660,50 ± 174,64	2,62	8,413 ± 0,091
75	750	63757,83 ± 1102,99	6,36	8,500 ± 0,088
150	1500	126021 ± 1697,38	8,51	8,473 ± 0,118
1500	15000	1289381 ± 12516,00	6,20	8,453 ± 0,152
2500	25000	2142089,5 ± 41040,57	3,22	8,510 ± 0,110
6000	60000	4984471,5 ± 69825,48	2,61	8,458 ± 0,027

CV = porcentaje del coeficiente de variación

SD = desviación estándar

La recuperación fue determinada en base la recta de regresión correspondiente a las soluciones estándar de oxitetraciclina y también en base a la recta de regresión de las muestras tisulares fortificadas (**Tablas 20 y 21**).

TABLA 20. Recuperación de oxitetraciclina en base a la recta de regresión de soluciones estándar de oxitetraciclina

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración recuperada (ng/ml) Valor medio \pm DS	% Recuperación Valor medio \pm DS CV
50	47,43 \pm 1,13	94,86 \pm 2,25 2,37
75	70,63 \pm 2,54	94,169 \pm 3,38 3,59
750	692,36 \pm 12,50	92,315 \pm 1,667 1,81
1500	1399,19 \pm 18,69	93,279 \pm 1,246 1,33
15000	14586,89 \pm 141,89	97,246 \pm 0,946 0,97
25000	24253,79 \pm 465,26	97,015 \pm 1,861 1,92
60000	56477,02 \pm 791,59	94,128 \pm 1,319 1,40

TABLA 21. Recuperación de oxitetraciclina en plasma en base a la recta de regresión de muestras de plasma fortificadas

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración recuperada (ng/ml) Valor medio \pm DS	% Recuperación Valor medio \pm DS CV
50	31,02 \pm 1,04	62,048 \pm 2,09 3,37
75	58,42 \pm 1,53	77,901 \pm 2,04 2,62
750	499,61 \pm 13,28	66,615 \pm 1,770 2,66
1500	1250,11 \pm 1984	83,341 \pm 1,323 1,59
15000	15252,60 \pm 1150,66	101,684 \pm 1,004 0,99
25000	25516,77 \pm 494,01	102,067 \pm 1,976 1,94
60000	59730,91 \pm 840,50	99,552 \pm 1,401 1,41

Como se demuestra, en los resultados obtenidos, la recuperación del compuesto oxitetraciclina alcanzó un rango de 62,048 a 102,067% y un valor medio de 84,744% para la recta de calibrado de plasma fortificado.

3.3. Análisis de datos

La curva de las concentraciones medias plasmáticas de oxitetraciclina obtenidas tras la administración oral única de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. y tras la administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días consecutivos se fijaron secuencialmente a un modelo compartimental, monocompartimental, bicompartimental y múltiple por el uso del programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (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).

α Constante híbrida de la fase inicial de distribución.

β 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 11**), 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 12**), 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 β 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 11. 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

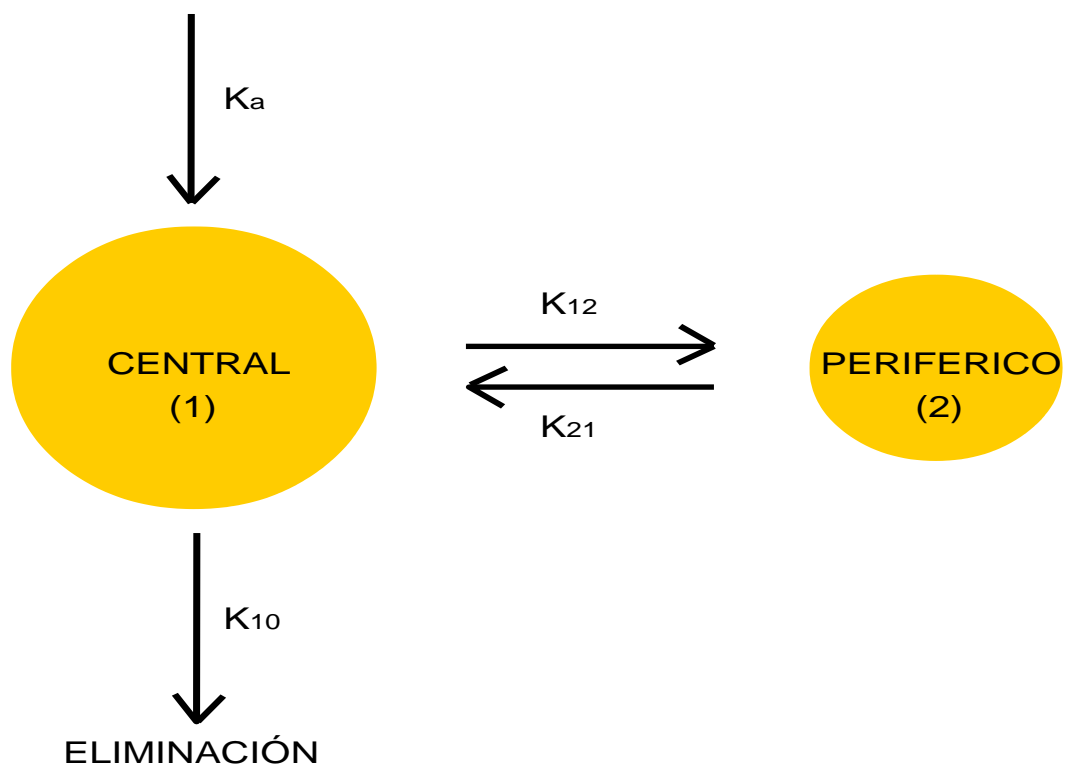
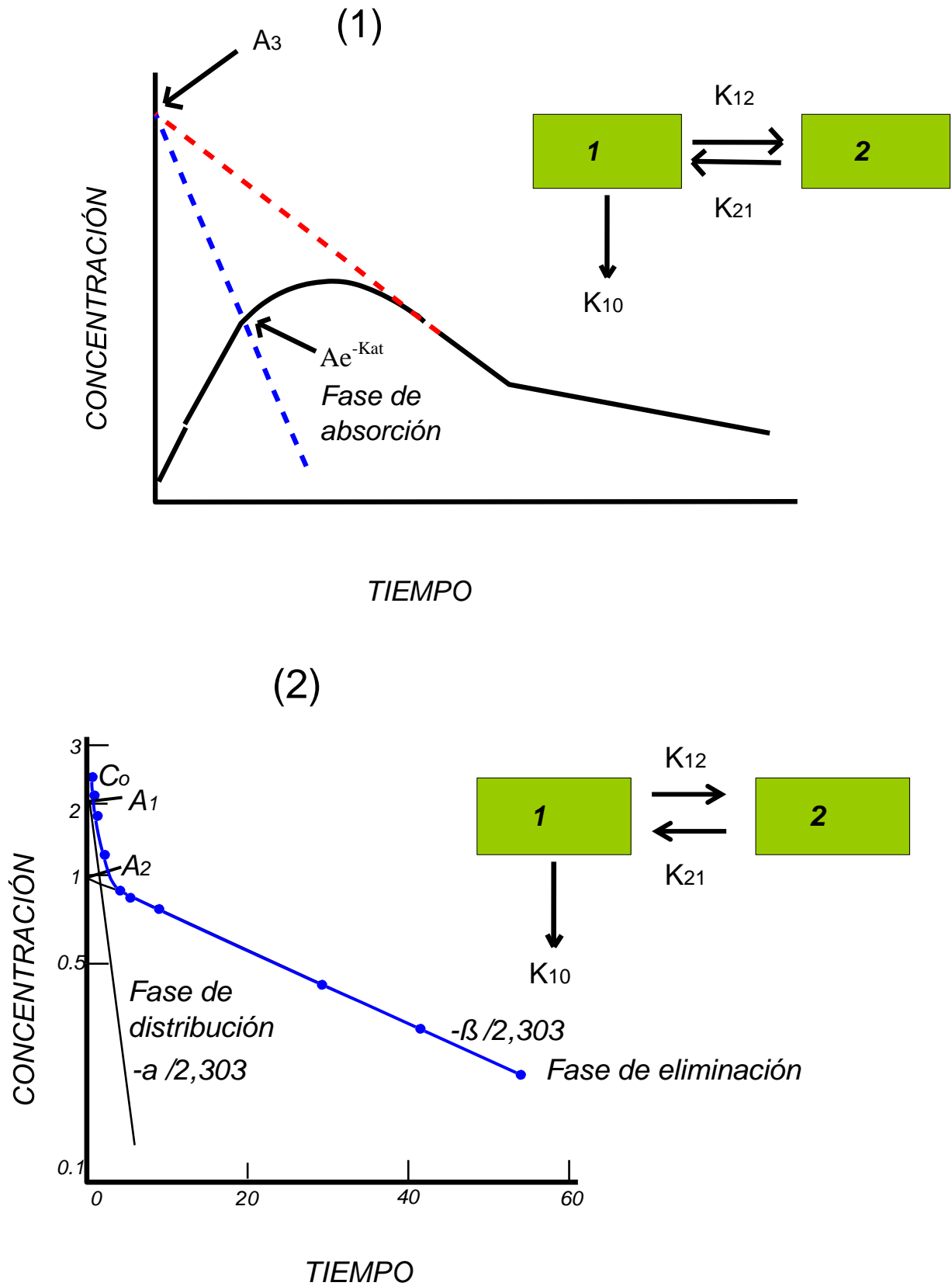


Figura 12. Distintas fases de los perfiles de concentración plasmática de un fármaco tras administración de una dosis oral (1) e intravenosa (2)



En los estudios de disposición, los coeficientes A_1 , A_2 y A_3 y las constantes de disposición α , β 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 oxitetraciclina fueron:

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

α y β 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 (α).

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

$t_{1/2a}$ 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") *

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

V₁ Volumen de distribución en el compartimiento central*

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

V₂ Volumen aparente de distribución en el compartimiento secundario*

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

K₁₂ Constante de distribución desde el compartimiento central al compartimiento periférico

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

K₂₁ Constante de retorno desde el compartimiento periférico al compartimiento central

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

K₁₀ Constante de eliminación.

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

T_{max} Tiempo necesario para alcanzar la C_{max}.

C_{max} Concentración máxima en plasma tras administración oral.

* La biodisponibilidad (F) o fracción de dosis absorbida no fue calculada por falta del estudio tras administración IV.

3.4. Fármacos y reactivos

- Acetonitrilo (CH₃CN, Grado HPLC) Ref: AC03292500 (Sharlau).
- Ácido etilen diamino tetracético sal disódica dihidrato (C₁₀H₁₄N₂O₈·2H₂O). Ref: 1.00495.0100 (Merck).
- Ácido oxálico 0,01M (C₂H₂O₄) Ref: 1.00495.0100 (Merck).
- Ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇ ·H₂O) Ref: 1.00244.1000 (Merck)
- Ácido clorhídrico 37% (HCl) Ref: 141020 (Panreac).
- Fosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) Ref: 1.06580.1000 (Merck).
- Metanol (CH₃OH, Grado HPLC) Ref: ME03062500 (Sharlau).
- Oxitetraciclina clorhidrato (C₂₂H₂₄N₂O₉·Cl, CAS: 2058-46-0) Ref: O-5875 (Sigma).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Farmacocinética de oxitetraciclina tras administración única oral en cerdos

4.1.1. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina obtenidos de cada animal tras la administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. se representan en la **Tabla 22**. Las **Figuras 13 a 16** ilustran los niveles plasmáticos de oxitetraciclina frente al tiempo, calculados tras administración oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en cerdos.

Tabla 22. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en cerdos

Tiempo tras dosis (h)	Oxitetraciclina ($\mu\text{g/ml}$)				
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Valor medio \pm DS
0,25 h	0,070	0,065	0,061	0,063	0,065 \pm 0,0038
0,5 h	0,314	0,317	0,231	0,232	0,273 \pm 0,048
1h	0,420	0,410	0,471	0,445	0,437 \pm 0,028
2h	0,797	0,810	0,811	0,842	0,815 \pm 0,019
4h	0,576	0,570	0,588	0,582	0,579 \pm 0,0075
6h	0,367	0,320	0,321	0,380	0,347 \pm 0,031
8h	0,260	0,269	0,251	0,261	0,260 \pm 0,0076
12h	0,186	0,188	0,178	0,182	0,183 \pm 0,0044
24 h	0,066	0,071	0,063	0,069	0,067 \pm 0,0036

Figura 13. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en el animal 1

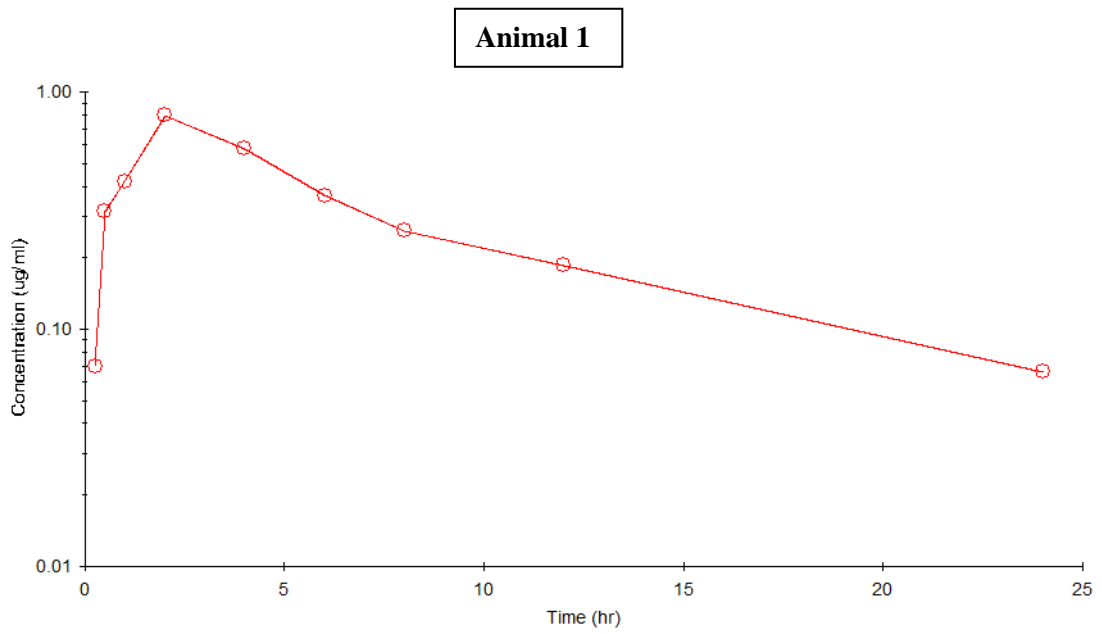


Figura 14. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en el animal 2

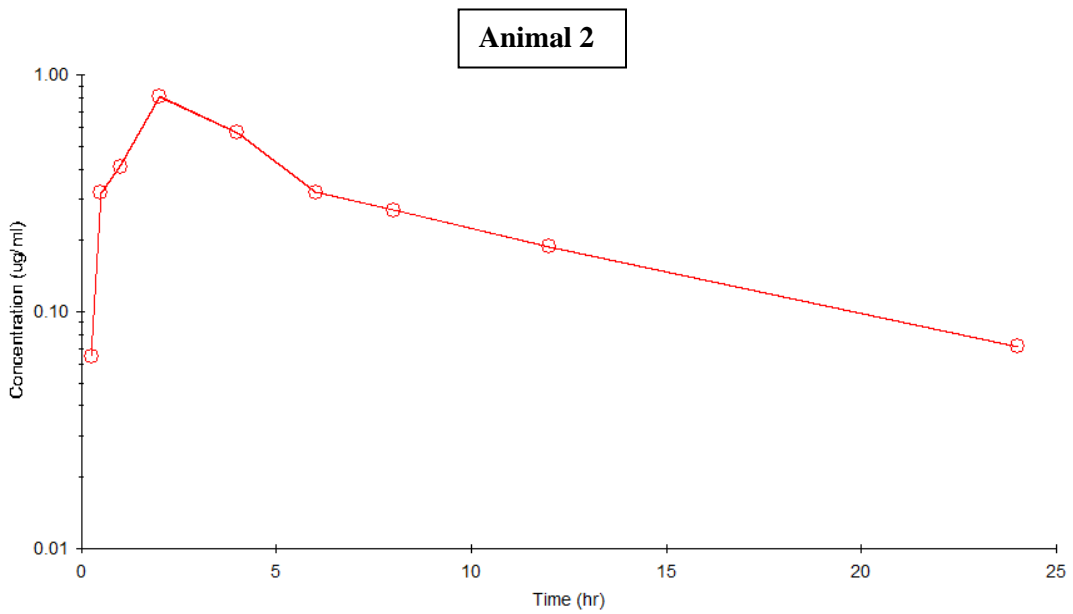


Figura 15. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en el animal 3

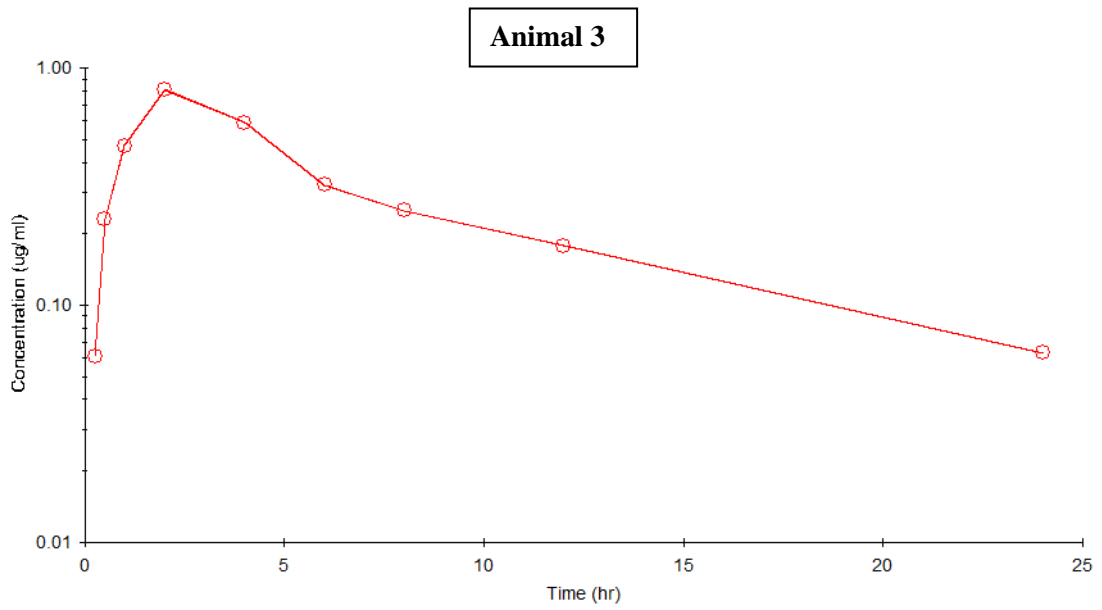
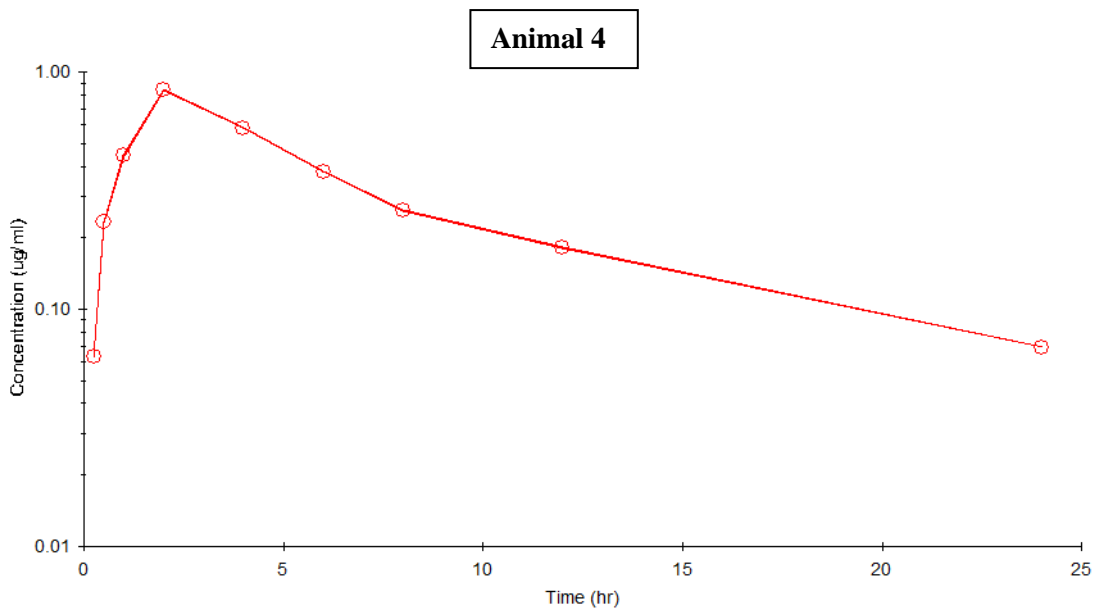


Figura 16. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en el animal 4



4.1.2. Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina vs tiempo obtenidos tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v., se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple-modelo compartimental usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (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 oxitetraciclina 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 oxitetraciclina; A_1 , A_2 y A_3 son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución, β 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 oxitetraciclina de cada animal calculados a partir de la administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/ kg p.v. se presentan en la **Tabla 23**.

Tras la administración oral de oxitetraciclina (**Tabla 23**) se observó que el fármaco fue absorbido y más lentamente eliminado obteniéndose una semivida de absorción media de ($t_{1/2a}$) de $1,227 \pm 0,154$ h, y alcanzando una concentración máxima media (C_{max}) de $0,593 \pm 0,009$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo medio (T_{max}) de $2,538 \pm 0,140$ h. Tras la administración única oral de oxitetraciclina se observó un valor medio de la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de $11,206 \pm 1,770$ h.

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v. en cerdos

Parámetros*	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Valor medio ± DS
A (µg/ml)	2,850	1,102	3,852	3,872	2,919 ± 1,302
B (µg/ml)	0,241	0,429	0,314	0,256	0,310 ± 0,085
C (µg/ml)	3,091	1,531	4,166	4,128	3,229 ± 1,237
α (h ⁻¹)	0,333	0,309	0,427	0,380	0,362 ± 0,052
β (h ⁻¹)	0,054	0,076	0,066	0,055	0,063 ± 0,010
K01 (h ⁻¹)	0,511	0,683	0,572	0,524	0,573 ± 0,078
K10 (h ⁻¹)	0,174	0,142	0,193	0,185	0,174 ± 0,022
K12 (h ⁻¹)	0,109	0,077	0,154	0,137	0,119 ± 0,034
K21 (h ⁻¹)	0,104	0,166	0,147	0,113	0,133 ± 0,029
AUC (µg. h/ml)	6,935	6,928	6,454	6,958	6,819 ± 0,243
t_{1/2α} (h)	1,355	1,015	1,212	1,324	1,227 ± 0,154
t_{1/2α} (h)	2,080	2,243	1,620	1,824	1,942 ± 0,275
t_{1/2 β} (h)	12, 714	9,060	10,448	12,602	11,206 ± 1,770
T_{max} (h)	2,697	2,568	2,357	2,528	2,538 ± 0,140
C_{max} (µg/ml)	0,590	0,585	0,591	0,606	0,593 ± 0,009

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

4.2. Farmacocinética de oxitetraciclina tras administración múltiple oral durante 7 días en cerdos

4.2.1. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral

Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina obtenidos en cada animal tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.c./ día durante 7 días consecutivos se representan en la **Tabla 24 y Tabla 25**. Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.c./día durante 7 días se recogen para cada animal en las **Figuras 17 a 20** durante el periodo completo de dosificación (7 días). La **Figura 21** ilustra los niveles plasmáticos de oxitetraciclina de los cuatro animales, tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.c./ día durante 7 días consecutivos

Tabla 24. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina en cerdos (n=4) tras dosis oral de oxitetraciclina de 30 mg/kg/día durante 7 días consecutivos

NIVELES PLASMÁTICOS DE OXITETRACICLINA EN CERDOS (n=4) TRAS DOSIS ORAL (30 mg OTC/kg/día) OXITEVALL PREMEZCLA, 7 DÍAS								
Tiempo tras dosis (h)	Animal 1		Animal 2		Animal 3		Animal 4	
	Area cromatograma (vol. Inyección 100µl)	ng/ml plasma	Area cromatograma (vol. Inyección 100µl)	ng/ml plasma	Area cromatograma (vol. Inyección 100µl)	ng/ml plasma	Area cromatograma (vol. Inyección 100µl)	ng/ml plasma
0,25h D1	15060	178,994	15285	181,628	16835	199,772	16006	190,068
0,5h D1	141142	1654,886	131666	1543,961	161708	1895,627	160456	1880,971
1h D1	198803	2329,854	183592	2151,797	196439	2302,181	217126	2544,339
2h D1	347056	4065,275	346873	4063,133	357541	4188,010	378558	4434,031
4h D1	284216	3329,682	281444	3297,233	290888	3407,783	304226	3563,915
6h D1	203970	2390,338	218982	2566,065	228661	2679,366	221636	2597,133
8h D1	160450	1880,901	168880	1979,581	173381	2032,269	175829	2060,925
12h D1	76895	902,823	81357	955,054	84095	987,104	86142	1011,066
24h D1	34008	400,796	38084	448,509	35316	416,107	38490	453,261
2h D2	329177	3855,987	363432	4256,969	357971	4193,044	355409	4163,053
4h D2	294818	3453,787	294583	3451,036	277846	3255,116	281178	3294,120
8h D2	173168	2029,776	179946	2109,118	190476	2232,380	229553	2689,807
24h D2	39801	468,608	42156	496,175	37892	446,261	36035	424,523
2h D3	364855	4273,626	365131	4276,857	368648	4318,026	341773	4003,433
4h D3	308915	3618,804	316008	3701,833	310515	3637,533	306730	3593,226
8h D3	198762	2329,374	198215	2322,971	171551	2010,847	193440	2267,076
24h D3	38806	456,960	40066	471,710	38306	451,107	45984	540,985
2h D4	350659	4107,451	346230	4055,606	355534	4164,516	374594	4387,629
4h D4	292379	3425,236	300467	3519,913	315304	3693,592	308027	3608,409
8h D4	179502	2103,920	183536	2151,141	210782	2470,078	176281	2066,216
24h D4	37680	443,780	41462	488,051	38664	455,298	43343	510,070
2h D5	360530	4222,999	343251	4020,734	362726	4248,705	372815	4366,805
4h D5	292460	3426,185	303750	3558,343	291366	3413,378	307753	3605,201
8h D5	163585	1917,599	159328	1867,767	172852	2026,077	171551	2010,847
24h D5	40750	479,716	41614	489,830	41891	493,073	45960	540,704
2h D6	363668	4259,732	364350	4267,715	370833	4343,604	396199	4640,533
4h D6	292545	3427,180	295745	3464,638	295556	3462,426	319572	3743,552
8h D6	183342	2148,871	187706	2199,955	191404	2243,243	173123	2029,249
24h D6	39279	462,497	40317	474,648	40342	474,940	40491	476,685
0,5h D7	123022	1442,776	121616	1426,318	156472	1834,336	141643	1660,750
1h D7	195194	2287,608	190924	2237,624	187289	2195,073	180871	2119,945
2h D7	343633	4025,206	356679	4177,920	397122	4651,338	355498	4164,095
4h D7	292092	3421,877	312373	3659,282	282663	3311,503	303704	3557,805
6h D7	206055	2414,744	226825	2657,874	229224	2685,956	208453	2442,815
8h D7	166217	1948,409	185463	2173,699	194930	2284,517	175705	2059,473
12h D7	77066	904,824	77192	906,299	98409	1154,661	81231	953,579
24h D7	37246	438,699	34624	408,007	45616	536,677	48995	576,231

Tabla 25. Niveles plasmáticos de oxitetraciclina en cerdos (n=4) tras dosis oral de oxitetraciclina de 30 mg/kg/día durante 7 días consecutivos

Tiempo tras dosis (h)	Tiempo acumulado (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Valor medio ± DS
		µg/ml plasma	µg/ml plasma	µg/ml plasma	µg/ml plasma	µg/ml plasma
0,25h D1	0,25	0,179	0,182	0,200	0,190	0,188 ± 0,0094
0,5h D1	0,5	1,655	1,544	1,896	1,881	1,744 ± 0,173
1h D1	1	2,330	2,152	2,302	2,544	2,332 ± 0,162
2h D1	2	4,065	4,063	4,188	4,434	4,188 ± 0,174
4h D1	4	3,330	3,297	3,408	3,564	3,400 ± 0,119
6h D1	6	2,390	2,566	2,679	2,597	2,558 ± 0,122
8h D1	8	1,881	1,980	2,032	2,061	1,988 ± 0,079
12h D1	12	0,903	0,955	0,987	1,011	0,964 ± 0,047
24h D1	24	0,401	0,449	0,416	0,453	0,430 ± 0,025
2h D2	26	3,856	4,257	4,193	4,163	4,117 ± 0,178
4h D2	28	3,454	3,451	3,255	3,294	3,364 ± 0,104
8h D2	32	2,030	2,109	2,232	2,690	2,265 ± 0,295
24h D2	48	0,469	0,496	0,446	0,425	0,459 ± 0,031
2h D3	50	4,274	4,277	4,318	4,003	4,218 ± 0,144
4h D3	52	3,619	3,702	3,638	3,593	3,638 ± 0,046
8h D3	56	2,329	2,323	2,011	2,267	2,233 ± 0,150
24h D3	72	0,457	0,472	0,451	0,541	0,480 ± 0,041
2h D4	74	4,107	4,056	4,165	4,388	4,179 ± 0,146
4h D4	76	3,425	3,520	3,694	3,608	3,562 ± 0,115
8h D4	80	2,104	2,151	2,470	2,066	2,198 ± 0,185
24h D4	96	0,444	0,488	0,455	0,510	0,474 ± 0,030
2h D5	98	4,223	4,021	4,249	4,367	4,215 ± 0,144
4h D5	100	3,426	3,558	3,413	3,605	3,501 ± 0,096
8h D5	104	1,918	1,868	2,026	2,011	1,956 ± 0,076
24h D5	120	0,480	0,490	0,493	0,541	0,501 ± 0,027
2h D6	122	4,260	4,268	4,344	4,641	4,378 ± 0,179
4h D6	124	3,427	3,465	3,462	3,744	3,524 ± 0,147
8h D6	128	2,149	2,200	2,243	2,029	2,155 ± 0,092
24h D6	144	0,462	0,475	0,475	0,477	0,472 ± 0,006
0,5h D7	144,5	1,443	1,426	1,834	1,661	1,591 ± 0,194
1h D7	145	2,288	2,238	2,195	2,120	2,210 ± 0,071
2h D7	146	4,025	4,178	4,651	4,164	4,255 ± 0,273
4h D7	148	3,422	3,659	3,312	3,558	3,488 ± 0,152
6h D7	150	2,415	2,658	2,686	2,443	2,550 ± 0,141
8h D7	152	1,948	2,174	2,285	2,059	2,117 ± 0,145
12h D7	156	0,905	0,906	1,155	0,954	0,980 ± 0,119
24h D7	168	0,439	0,408	0,537	0,576	0,490 ± 0,079

Figura 17. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en el animal 5

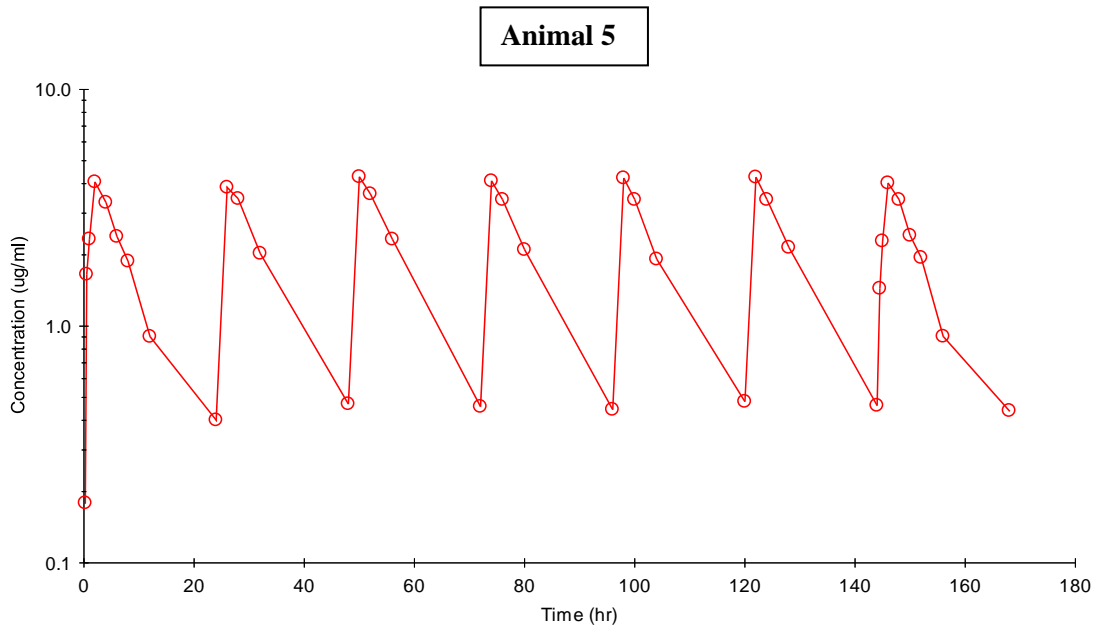


Figura 18. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en el animal 6

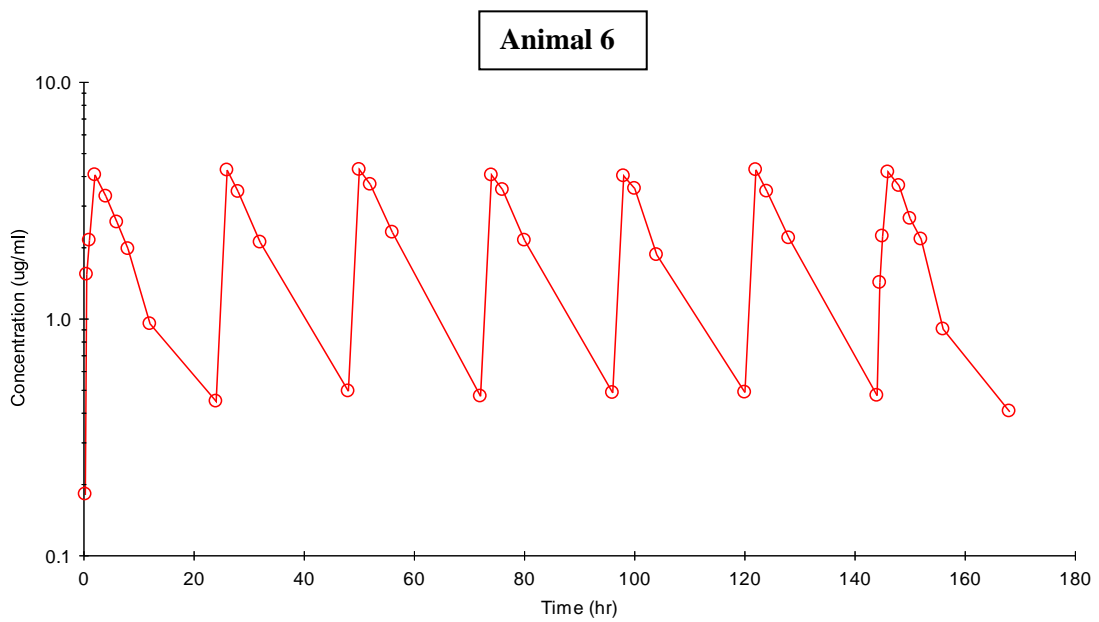


Figura 19. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en el animal 7

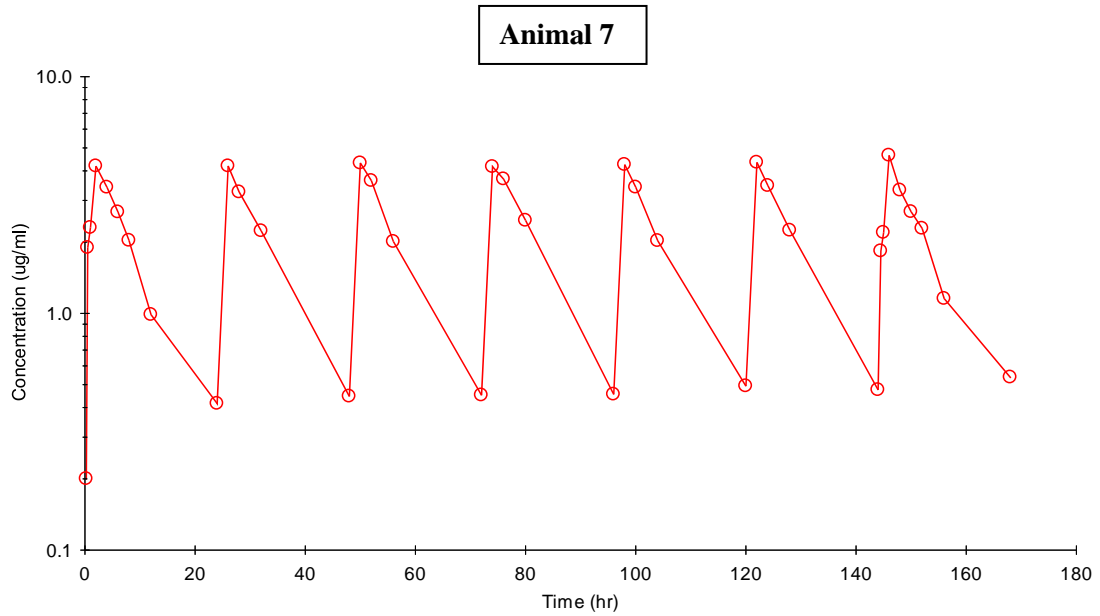


Figura 20. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de oxitetraciclina tras administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en el animal 8

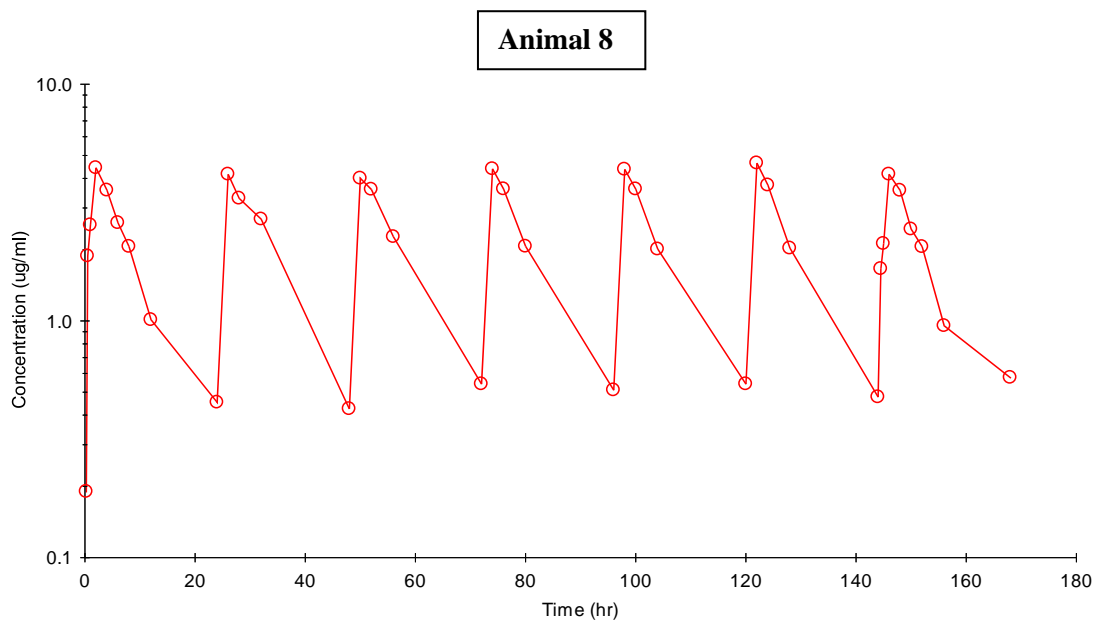
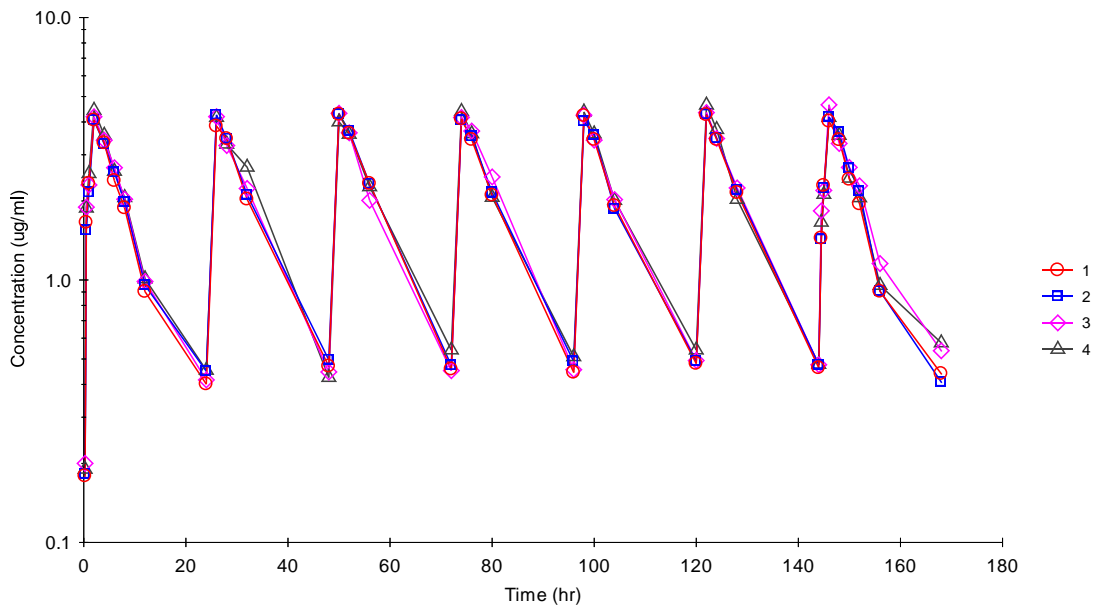


Figura 21. Niveles plasmáticos (µg/ml) de oxitetraciclina tras administración oral múltiple de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día durante 7 días en 4 cerdos



4.2.2. *Parámetros farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral*

Los niveles plasmáticos de oxitetraciclina obtenidos en cada animal tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v., se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple- modelo compartimental usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del criterio de información Akaike (YAMAOKA *et al.*, 1978).

Las curvas de disposición plasmática de oxitetraciclina tras administración oral múltiple (**Figuras 17 a 20**) 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 oxitetraciclina; A_1, A_2 y A_3 son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución, β 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 para cada animal y estimados en el primer día (D1) y tras la administración múltiple oral de 30 mg/kg p.v./ día se presentan en las **Tabla 26** y **Tabla 27**, respectivamente.

La oxitetraciclina presenta una absorción oral rápida como lo refleja la semivida de absorción $t_{1/2a}$ de $1,371 \pm 0,116$ h para el periodo completo de dosificación. Tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v./ día se obtuvo una concentración máxima (C_{max}) de $3,455 \pm 0,143$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de $2,816 \pm 0,118$ h. Tras la administración múltiple oral, la oxitetraciclina se elimina rápidamente del organismo, siendo la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) $11,434 \pm 0,438$ h.

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de oxitetraciclina tras la primera administración oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día en cerdos

Parámetros tras el primer día de administración	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Valor medio \pm DS
A ($\mu\text{g/ml}$)	10,429	7,561	8,249	10,354	$9,148 \pm 1,463$
B ($\mu\text{g/ml}$)	1,537	1,757	1,979	1,888	$1,790 \pm 0,192$
C ($\mu\text{g/ml}$)	11,966	9,318	10,228	12,242	$10,939 \pm 0,020$
α (h^{-1})	0,300	0,267	0,275	0,309	$0,288 \pm 0,020$
β (h^{-1})	0,059	0,058	0,066	0,063	$0,062 \pm 0,004$
K01 (h^{-1})	0,569	0,590	0,614	0,596	$0,592 \pm 0,019$
K10 (h^{-1})	0,158	0,134	0,147	0,155	$0,149 \pm 0,011$
K12 (h^{-1})	0,089	0,075	0,070	0,092	$0,082 \pm 0,011$
K21 (h^{-1})	0,112	0,116	0,125	0,125	$0,120 \pm 0,007$
AUC ($\mu\text{g. h/ml}$)	39,773	42,559	43,038	43,074	$42,111 \pm 1,576$
$t_{1/2 a}$ (h)	1,219	1,174	1,129	1,162	$1,171 \pm 0,037$
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	2,310	2,597	2,518	2,240	$2,416 \pm 0,169$
$t_{1/2 \beta}$ (h)	11,751	11,836	10,411	11,063	$11,265 \pm 0,666$
V1 (L/kg)	4,759	5,238	4,750	4,496	$4,811 \pm 0,310$
V2 (L/kg)	3,788	3,371	2,670	3,306	$3,284 \pm 0,461$
T_{max} (h)	2,691	2,828	2,716	2,632	$2,717 \pm 0,082$
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3,372	3,290	3,627	3,639	$3,482 \pm 0,178$

Tabla 27. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de oxitetraciclina tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día, durante 7 días consecutivos en cerdos

Parámetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Valor medio ± DS
	5-VALL	6-VALL	7-VALL	8-VALL	
A (µg/ml)	14,356	16,443	15,851	11,438	14,447 ± 2,374
B (µg/ml)	1,406	1,541	1,723	1,816	1,621 ± 0,183
C (µg/ml)	15,762	17,984	17,574	13,254	16,143 ± 2,155
α (h ⁻¹)	0,312	0,309	0,318	0,313	0,313 ± 0,004
β (h ⁻¹)	0,057	0,061	0,062	0,062	0,060 ± 0,002
K01 (h ⁻¹)	0,505	0,465	0,493	0,571	0,508 ± 0,045
K10 (h ⁻¹)	0,171	0,171	0,171	0,159	0,168 ± 0,006
K12 (h ⁻¹)	0,094	0,089	0,093	0,094	0,093 ± 0,002
K21 (h ⁻¹)	0,105	0,109	0,116	0,122	0,113 ± 0,007
AUC (µg .h/ml)	39,175	39,851	41,794	42,584	40,851 ± 1,602
t_{1/2a} (h)	1,373	1,491	1,407	1,213	1,371 ± 0,116
t_{1/2α} (h)	2,218	2,239	2,182	2,214	2,213 ± 0,023
t_{1/2 β} (h)	12,051	11,436	11,087	11,162	11,434 ± 0,438
V1 (L/kg)	4,466	4,391	4,204	4,419	4,370 ± 0,115
V2 (L/kg)	3,993	3,583	3,365	3,399	3,585 ± 0,288
T_{max} (h)	2,791	2,953	2,850	2,669	2,816 ± 0,118
C_{max} (µg/ml)	3,348	3,322	3,537	3,614	3,455 ± 0,143

4.3. 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 oxitetraciclina, ello constituye la modelización PK/PD en relación con la eficacia del antibiótico, además de minimizar el desarrollo de resistencias.

Las tetraciclinas han sido clasificadas como concentración y tiempo dependiente, es decir, co-dependiente (la acción antimicrobiana depende de la duración de la exposición y de la concentración mantenida del fármaco) (TOUTAIN, 2003a). Se analizan tomando en consideración $AUC > CMI$ y $T > CMI$. Si bien, el índice PK / PD más representativo para seleccionar y optimizar la dosis, es decir predecir la eficacia clínica, es el índice $AUC_{0-24h} / CMI > 25$, en animales inmunocompetentes (KAYS y DENYS, 2001).

La **Tabla 28** recoge los CMIs descritos en la literatura para microorganismos patógenos comunes en cerdos.

La **Tabla 29** muestra la integración PK/PD para oxitetraciclina en plasma de cerdos tras administración oral, vía pienso medicado, dosis única de 5 mg oxitetraciclina / kg p.v.

La **Tabla 30** muestra la integración PK/PD para oxitetraciclina en plasma de cerdos tras administración oral, vía pienso medicado, dosis múltiples de 30 mg oxitetraciclina / kg p.v./día, durante 7 días consecutivos.

Tabla 28. Agentes patógenos comunes en cerdos; CMI para la oxitetraciclina

MICROORGANISMO	ESPECIE ANIMAL	OTC		Referencia
		CMI ₅₀ µg/ml	CMI ₉₀ µg/ml	
<i>Streptococcus suis</i>	Porcino	0,06-0,25	-	PIJPERS <i>et al.</i> 1989
<i>Clostridium perfringens</i>	Varias especies	0,1	-	PRESCOTT y BAGGOT, 1991
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Porcino	0,25-0,5	-	PIJPERS <i>et al.</i> 1989 KADLEC <i>et al.</i> 2004 WALLMANN <i>et al.</i> 2004
<i>Brucella spp</i>	Varias especies	0,06	-	FARRELL <i>et al.</i> , 1976 MATEU DE ANTONIO y MARTIN, 1995 BAYRAM <i>et al.</i> , 2011
<i>Haemophilus pleuropneumoniae</i>	Porcino	0,25-0,5	-	PIJPERS <i>et al.</i> 1989
<i>Haemophilus parasuis</i>	Porcino	0,5	-	MARTÍN DE LA FUENTE <i>et al.</i> 2007
<i>Pasteurella multocida</i>	Porcino	0,25-0,5	-	PIJPERS <i>et al.</i> 1989 FALES <i>et al.</i> , 1990 YOSHIMURA <i>et al.</i> 2001 WALLMANN <i>et al.</i> 2004 VERA-LIZARAZO <i>et al.</i> , 2006
<i>Campylobacter spp</i>	Varias especies	0,2-0,5	-	PRESCOTT y BAGGOT, 1991
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Porcino	0,04-0,25	-	YAMAMOTO <i>et al.</i> 1986 HANNAN <i>et al.</i> 1989 LE CARROU <i>et al.</i> , 2006

Tabla 29. Integración PK/PD a partir del estudio farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración única oral de 5 mg oxitetraciclina/ kg p.v. en cerdos

Parámetros cinéticos	
C_{max} (µg/ml)	0,593
AUC (µg h /ml)	6,819
Índices PK / PD	
AUC/ CMI	^a 114-27; ^b 68; ^{c,e,g} 27-14 ; ^d 114; ^f 14; ^h 34-14, ⁱ 170-27
C_{max}/ CMI	^a 10-2; ^b 6; ^{c,e,g} 2-1; ^d 10; ^f 1; ^h 3-1; ⁱ 15-2
Tiempo ≥ CMI (0,183 ± 0,004 µg/ml, nivel plasmático observado a las 12 h)	50% del intervalo de dosis
Tiempo ≥ CMI (0,067 ± 0,004 µg/ml, nivel plasmático observado a las 24 h)	100% del intervalo de dosis (tomando como intervalo de dosis cada 24 h)

(a) *Streptococcus suis*; (b) *Clostridium perfringens*; (c) *Bordetella bronchiseptica*
 (d) *Brucella mellitensis*; (e) *Haemophilus pleuropneumoniae*; (f) *Haemophilus parasuis*
 (g) *Pasteurella multocida*; (h) *Campylobacter* spp; (i) *Mycoplasma hyopneumoniae*

Tabla 30. Integración PK/PD a partir del estudio farmacocinéticos de oxitetraciclina tras administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v./día durante 7 días consecutivos en cerdos

Parámetros cinéticos	
C_{max} (µg/ml)	3,455
AUC (µg h/ ml)	40,851
Índices PK / PD	
AUC/ CMI	^{a,i} 680 - 163; ^b 408; ^{c,e,g,h} 163 - 82; ^d 680; ^f 82
C_{max}/ CMI	^{a,i} 57-14; ^b 34; ^{c,e,g,h} 14-7; ^f 7;
Tiempo ≥ CMI (0,964 ± 0,047 µg/ml, nivel plasmático observado a las 12 h tras la primera dosis, y 0,980±0,119 µg/ml, nivel plasmático observado a las 12 h tras la última dosis)	50% del intervalo de dosis
Tiempo ≥ CMI (0,430 ± 0,025 µg/ml, nivel plasmático observado a las 24 h tras la primera dosis, y 0,490 ± 0,079 µg/ml, nivel plasmático observado a las 24 h tras la última dosis)	100% del intervalo de dosis (tomando como intervalo de dosis cada 24 h)

(a) *Streptococcus suis*; (b) *Clostridium perfringens*; (c) *Bordetella bronchiseptica*
(d) *Brucella mellitensis*; (e) *Haemophilus pleuropneumoniae*; (f) *Haemophilus parasuis*
(g) *Pasteurella multocida*; (h) *Campylobacter* spp; (i) *Mycoplasma hyopneumoniae*

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las tetraciclinas suponen una importante herramienta antibiótica para el tratamiento frente a infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El uso inadecuado de estos antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencias bacterianas lo que podría provocar la retirada de estos antibióticos del arsenal de fármacos veterinarios. Por lo tanto, se deben considerar en la propia especie animal de destino las características farmacocinéticas de estos antibióticos combinadas con su ensayo de susceptibilidad microbiológica en la elección de los tratamientos terapéuticos para maximizar la eficacia del fármaco y minimizar el desarrollo de resistencias bacterianas.

La oxitetraciclina, antibiótico objeto de nuestro estudio, compuesto bacteriostático con amplio espectro de actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, especies aeróbicas y anaeróbicas (NEU, 1978), es ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades sistémicas bacterianas en medicina porcina, principalmente para enfermedades respiratorias e intestinales causadas por *Pasteurella* spp, *Salmonella* spp, y *E. coli*. En la literatura científica existe limitada información sobre la cinética plasmática de oxitetraciclina, la mayoría de los estudios fueron realizados determinando los niveles plasmáticos del antibiótico por ensayo microbiológico suministrando datos cinéticos muy diversos e incompletos, datos que son difíciles para sustentar un régimen de dosificación que señale una eficacia clínica y controle el desarrollo de la aparición de resistencias. El presente estudio establece la farmacocinética plasmática de oxitetraciclina en cerdos tras administración múltiple oral de 30 mg/kg durante 7 días consecutivos, a la vez que realiza un análisis PK/PD para poder predecir una potencial eficacia de la oxitetraciclina con el régimen de dosificación estudiado.

Las tetraciclinas se absorben adecuadamente aunque incompletamente, del tracto gastrointestinal. El estómago e intestino son los principales lugares de absorción. Cuando las tetraciclinas se administran oralmente, la fracción de dosis absorbida es inversamente proporcional a la dosis administrada, y a la concentración de calcio y otros cationes divalentes que pueden estar contenidos en el tracto gastrointestinal, por ello nuestro estudio fue diseñado con la administración de oxitetraciclina en animales en ayuno. En el presente estudio se demuestra que la oxitetraciclina a dosis orales de 5 y 30 mg/kg, las curvas de niveles plasmáticos vs tiempo se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético, con una fase de absorción y distribución rápida seguida de una fase de eliminación más lenta, comportamiento también observado en cerdos por otros

investigadores (MERCER *et al.*, 1978; MEVIUS *et al.*, 1986; PIJPERS *et al.*, 1990). En nuestra investigación, se demuestra en cerdos que la oxitetraciclina se absorbe y se distribuye rápidamente en el organismo corporal. La velocidad de absorción de oxitetraciclina tras su administración oral no fue dosis dependiente, tras dosis oral de 5 mg/kg la semivida de absorción ($t_{1/2a}$) fue $1,227 \pm 0,154$ y tras dosis de 30 mg/kg fue $1,371 \pm 0,116$ horas, semividas menores que la descrita por PIJPERS *et al.*, (1991a) donde cerdos con pleuroneumonía presentan una $t_{1/2a}$ de 3,03 horas, probablemente debido a un menor vaciado del contenido gástrico. Se conoce que durante estados febriles, las condiciones de la función gástrica pueden ser inhibidas por un descenso de la velocidad de vaciamiento gástrico y por el aumento del pH que hace además que las tetraciclinas precipiten y la velocidad y grado de absorción en el tracto intestinal disminuya (VAN MIERT, 1980). En nuestro estudio, tras dosis única oral de oxitetraciclina de 5 mg/kg, se obtiene una concentración plasmática máxima de $0,593 \pm 0,009$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de $2,538 \pm 0,140$ horas; tras dosis múltiple oral de oxitetraciclina de 30 mg/kg, se obtiene una concentración plasmática máxima de $3,455 \pm 0,143$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de $2,816 \pm 0,118$ horas, demostrando que el grado de absorción fue dosis-dependiente, pero no la velocidad de absorción. MEVIUS *et al.* (1986) observaron en cerdos una C_{max} de $1,27$ $\mu\text{g/ml}$ en un T_{max} de 3 horas tras dosis oral de oxitetraciclina de 20 mg/kg. HALL *et al.* (1989) establecen en cerdos tras administración intramuscular de 20 mg/kg de oxitetraciclina una C_{max} de $6,7 \pm 3,4$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 1,5 horas.

La oxitetraciclina fue rápidamente distribuida en el organismo presentando una semivida de distribución ($t_{1/2a}$) de $1,942 \pm 0,275$ horas y de $2,213 \pm 0,023$ horas tras dosis oral de 5 mg/kg y tras dosis oral múltiple de 30 mg/kg, respectivamente. MERCER *et al.* (1978) observan una menor velocidad de distribución de la oxitetraciclina en cerdos jóvenes de 8-10 semanas de edad, con una $t_{1/2a}$ de $6,71 \pm 1,13$ min. En cerdos, la oxitetraciclina presenta altos valores de volumen de distribución en el compartimento central (V1) $4,370 \pm 0,115$ L/kg, y en el compartimento secundario (V2) $3,585 \pm 0,288$ L/kg, resultado similar al observado por MERCER *et al.* (1978), MEVIUS *et al.* (1986) y KNIFFEN *et al.* (1989) lo que sugiere que se distribuye ampliamente a los tejidos.

La eliminación de oxitetraciclina en cerdos es equiparable a la de otras especies de animales domésticos (TESKE *et al.*, 1973; ZIV y SULMAN, 1974). En nuestro estudio, la oxitetraciclina fue eliminada del organismo corporal lentamente, la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) fue de $11,206 \pm 1,770$ h y de $11,434 \pm 0,438$ h tras dosis oral única de 5 mg/kg, y tras dosis múltiple oral de 30 mg/kg, respectivamente, más prolongada que la observada también en cerdos por MERCER *et al.* (1978) de $3,87 \pm 0,62$ h, probablemente debido a que estos investigadores utilizaron para el análisis de oxitetraciclina un método microbiológico. Otros investigadores también describen una lenta eliminación de la oxitetraciclina. MEVIUS *et al.* (1986) tras dosis oral de 20 mg/kg en cerdos observaron una semivida de eliminación en un rango de 11,6-17,2 horas. KNIFFEN *et al.* (1989) describen para la tetraciclina una semivida de eliminación en cerdos de 16 horas. Se conoce que la oxitetraciclina sufre circulación enterohepática (HUBER, 1977), lo que puede contribuir a altos valores del volumen de distribución y de semividas de eliminación encontrados. Nuestros resultados de forma satisfactoria demuestran que tras el régimen terapéutico de dosis oral de 30 mg/kg durante 7 días no se aprecian procesos de saturación en la eliminación del fármaco, ya que la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) en el primer día tras la dosis presenta un valor de $11,265 \pm 0,666$ h, y tras 7 días de dosificación la ($t_{1/2\beta}$) $11,434 \pm 0,438$ h. El régimen de dosificación elegido, dosis oral de 30 mg/kg/día durante 7 días proporciona valores de C_{max} y de AUC óptimos para una eficacia clínica adecuada, además también proporciona concentraciones de oxitetraciclina superiores a $0,490 \pm 0,079$ $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo al menos de 24 horas, periodo de tiempo más largo que el observado por otros investigadores (XIA *et al.*, 1983). Una concentración plasmática mínima de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ es recomendada como la CMI que debe ser alcanzada en sangre después de dosis terapéuticas para el caso de las tetraciclinas. Es deseable que la concentración plasmática de un antibiótico co-dependiente tenga un valor igual o mayor que la CMI del organismo infectante que causa la enfermedad.

El perfil de la concentración plasmática de un antimicrobiano es más informativo que la propia dosis. La dosis solo es nominal, pero en cambio el perfil de la concentración plasmática vs tiempo es controlado por la dosis (la dosis la controla el veterinario) y por el animal (a través de su estado fisiológico). El conocimiento de la concentración plasmática nos permitirá determinar no solo la dosis sino también el intervalo de la dosis (TOUTAIN, 2003). De cualquier forma, en aquellos casos en que el organismo infectante este localizado intracelularmente, la concentración plasmática podría ser de menos utilidad para predecir de forma correlativa concentraciones en el lugar de infección.

El presente estudio demuestra la utilidad de la integración de los índices PK/PD para el desarrollo de regímenes de dosificación frente a patógenos específicos para el caso del antibiótico oxitetraciclina en cerdos. En general se admite que para predecir la eficacia de un fármaco la razón AUC/CMI, índice usado para quinolonas, la razón C_{max}/CMI, índice usado para aminoglucósidos, y T<CMI (es decir tiempo en que la concentración plasmática es mayor a la CMI del patógeno infectante) son los índices comúnmente usados para señalar una dosis que sea eficaz y a la vez minimice la aparición de resistencias (SCHENTAG *et al.*, 1985; HYATT *et al.*, 1995; DALHOFF *et al.*, 2009). Para el caso de las tetraciclinas, clasificadas como antibióticos co-dependientes, el índice más recomendado es AUC/CMI \geq 25 (BURGES *et al.*, 2006).

Nuestros resultados tomando en consideración los índices PK/PD (AUC/CMI, C_{max}/CMI y T> CMI), demuestran que el régimen de dosificación estudiado, dosis oral de oxitetraciclina 30 mg/kg, 7 días, predice eficacia clínica frente a los patógenos *Streptococcus suis*; *Clostridium perfringens*, *Brucella mellitensis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, y en menor grado frente a *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter* spp. y *Mycoplasma hyopneumoniae*

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El presente estudio establece la farmacocinética plasmática de oxitetraciclina en cerdos tras administración múltiple oral de 30 mg/kg durante 7 días consecutivos, a la vez que realiza un análisis PK/PD para poder predecir una potencial eficacia de la oxitetraciclina con el régimen de dosificación estudiado.
2. La curvas concentración plasmática-tiempo de oxitetraciclina encontradas experimentalmente en cerdos tras la administración de dosis única oral, 5 mg oxitetraciclina/ kg p.v., se ajustan adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose para la curva de niveles medios-tiempo la siguiente ecuación exponencial:

$$C_p = 2,919 \times e^{-0,362 t} + 0,310 \times e^{-0,063 t} - 3,229 \times e^{-0,573 t}$$

3. La curvas concentración plasmática-tiempo de oxitetraciclina encontradas experimentalmente en cerdos tras la administración dosis múltiple oral, 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v., se ajustan adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose para la curva de niveles medios-tiempo la siguiente ecuación exponencial:

$$C_p = 14,447 \times e^{-0,313 t} + 1,621 \times e^{-0,060 t} - 16,143 \times e^{-0,508 t}$$

4. En cerdos, la oxitetraciclina se absorbe de forma rápida tras administración de dosis única oral de 5 mg oxitetraciclina/kg p.v., con una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2\alpha}$) de $1,227 \pm 0,154$ h; alcanzándose una concentración máxima plasmática (C_{\max}) de $0,593 \pm 0,009$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{\max}) de $2,538 \pm 0,140$ h. Tras su absorción, la oxitetraciclina se distribuye con una semivida plasmática de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de $1,942 \pm 0,275$ h seguido de una eliminación lenta con una semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de $11,206 \pm 1,770$ h.

5. En cerdos, la oxitetraciclina tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./ día, durante 7 días, no presenta acumulación y/o saturación en base a los parámetros de absorción 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.
6. Tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v./día, 7 días, se obtuvo una semivida plasmática de absorción rápida ($t_{1/2a}$) de $1,371 \pm 0,116$ h, una concentración plasmática máxima (C_{max}) de $3,455 \pm 0,143$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de $2,816 \pm 0,118$ h. Tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/kg p.v./día, durante 7 días, la oxitetraciclina se elimina lentamente del organismo, siendo la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de $11,434 \pm 0,438$ h.
7. El presente estudio demuestra la utilidad de la integración de los índices PK/PD para el desarrollo de regímenes de dosificación frente a patógenos específicos para el caso del antibiótico oxitetraciclina en cerdos. Para el caso de las tetraciclinas, clasificadas como antibióticos co-dependientes, una concentración plasmática de $0,5$ $\mu\text{g/ml}$ es recomendada como la CMI que debe ser alcanzada en sangre tras dosis terapéuticas. Además, el índice PK/PD más recomendado es $AUC/CMI \geq 25$ y $T > CMI$, es decir en el periodo de tiempo de todo el intervalo de dosis, las concentraciones plasmáticas del antibiotico deben ser \geq CMI del patógeno infectante.
8. Tras la administración múltiple oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v./día, 7 días, se obtuvo un AUC de $40,851 \pm 1,602$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$), y durante todo el intervalo de dosis (24 horas) la concentración plasmática fue $> 0,490 \pm 0,079$ $\mu\text{g/ml}$.
9. En función de los resultados de nuestro estudio farmacocinético y teniendo en cuenta la integración PK/PD, se sugiere que, un régimen de dosificación oral de 30 mg oxitetraciclina/ kg p.v./día, durante 7 días, podría ser de valor terapéutico en cerdos frente a infecciones comunes, aconsejándose no utilizar nunca dosis menores para minimizar el desarrollo de resistencias antimicrobianas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

AARESTRUP, F.M. & JENSEN, N.E. (1999) Susceptibility testing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. Evaluation of three different media of MIC-determinations and tablet diffusion tests. *Veterinary Microbiology* **64**, 299-305.

AARESTRUP, F.M., SEYFARTH, A.M. & ANGEN, O. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology* **101**, 143-146.

AARESTRUP, F.M. & KEMPF, I. (2006). Mycoplasma. In: Aarestrup F. M. (ed.) Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington D.C., USA: ASM Press, pp. 239-248. (ISBN 1-55581-306-2).

AARESTRUP, F.M., DURAN, C.O. & BURCH D.G.S. (2008). Antimicrobial Resistance in swine production. *Animal Health Research Reviews* **9** (2),135-148.

AARESTRUP, F.M., WEGENER, H.C. & COLLINGNON, P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **6**, (5), 733-755.

ACAR, J.F.(1997) Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. *Clinical Infectious Diseases* **24**:S17–S18.

ACAR, J.F., BOUANCHAUD, D.H., CHABBERT, Y.A.(1977) Evolutionary aspects of plasmid mediated resistance in a hospital environment. in Topics in infectious diseases. R-factors: their properties and possible control, eds Drews J., Hogerauers G. (Springer-Verlag, Vienna, Austria) **2**:5–23.

AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). (2011). Datos de Ventas de Antimicrobianos en España en el año 2009. http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/2011/docs/ventas-antimicrobianos_Espana-2009.pdf

AGASOSTER, T. (1992). Automated determination of oxytetracycline residues in muscle, liver, milk and egg by on-line dialysis and post-column reaction detection HPLC. *Food Additives and Contaminants* **9**(6), 615-622.

AGWUH, K.N., & MACGOWAN, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 256-265.

AHART J.G., BURTON, G.C. & BLENDEN, D.C. (1978). The influence of antimicrobial agents on the percentage of tetracycline-resistance bacteria in faeces of humans and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **44**, 183-190.

AITKEN, I.A, MORGAN, J.H., DALZIEL, R., BURCH, D.G.S. & RIPLEY, P.H. (1999) Comparative in vitro activity of valnemulin against bacterial pathogens. *Veterinary Record*, **144**, 128.

AMES, T., LARSON, V. & STOWE, C. (1983). Oxytetracycline concentrations in healthy and diseased calves. *American Journal Veterinary Research* **44**, (7), 1354-1357.

ANDERSON, M.D., STROH, S.L. & ROGERS, S. (1994). Tiamulin (Denagard®) activity in certain swine tissues following oral and intramuscular administration. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, Chicago Illinois, USA, pp115-118.

ANDERSON, K.L., MOATS, W.A., RUSHING, J.E., WESEN, D.P. & PAPICH, M.G. (1995). Potential for oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and high-performance liquid chromatography test methods. *American Journal of Veterinary Research* **56**(1), 70-77.

ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España) (2015). http://www.anice.es/v_portal/informacion/informacionver.asp?cod=9776&te=7&idage=11909

ANÓNIMO. (2005) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods, and humans in Denmark - *Escherichia coli*. pp 54 & 61. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). Report 2004.

ANÓNIMO. (2007) NOAH Compendium of Datasheets for Animal Medicines 2008. National Office of Animal Health Ltd, Enfield, Middlesex, UK.

ARIAS-ANDRÉS, M., MENA, F, C. & PINNOCK, M. (2014) Ecotoxicological evaluation of aquaculture and agriculture sediments with biochemical biomarkers and bioassays: antimicrobial potential exposure. *Journal of Environmental Biology* **35**(1), 107-117.

ARONSON, A.L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of American Veterinary Medical Association* **176**, 1061-1068.

ASHESHOV, E.H. (1975). The genetics of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* **47**, 361-409

BAEYENS, J.M., & DEL POZO, E. (2008). Antibióticos aminoglucósidos. Tetraciclinas y cloranfenicol. En: *Velázquez, Farmacología Básica y Clínica* (18ª Ed.). Lorenzo, O., Moreno,

BANTING, A.D., DUVAL, M., & GREGOIRE, S. (1985). A comparative study of serum kinetics of oxytetracycline in pigs and calves following intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **8**, 418-420.

BARDEN, T.C., BUCKWALTER, B.L., TESTA, R.T., PETERSEN, P.J., LEE, V.J. (1994) "Glycylcyclines." 3. 9-Aminodoxycyclinecarboxamides. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**:3205–3211.

BARKER, S.A. & WALKER, C.C. (1992). Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods. *Journal of Chromatography* **624**(1-2), 195-209.

BARRIGON, S., MONTAÑES, P. & LORENZO P. (1993). Tetraciclina y Cloranfenicol, Macrólidos y otros antibióticos, en: *Velázquez Farmacología*. (M.-H.-I. D. ESPAÑA ed.), Madrid, pp. 977-997.

BAXTER, P., & Mc KELLAR, Q. (1995). Plasma and lung concentrations of oxytetracyclines after its intramuscular administration in rats. *Laboratory Animal Science* **45**, (1), 107-109.

BENCHAOUI, H.A., NOWAKOWSKI, M., SHERINGTON, J., ROWAN, T.G. & SUNDERLAND, S.J. (2004) Pharmacokinetics and lung concentrations of tulathromycin in swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **27**, 203-210.

BERMÚDEZ-ALMADA, M.C., PÉREZ-TELLO, M.G., VALENZUELA-QUINTANAR, A.I. & VÁZQUEZ-MORENO, L. (1999). Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. *Journal of Food Science* **64**(4), 638-640.

BHATTACHARYA, M., PARAKH, A., & NARANG, M. (2009). Tigecycline. *Journal of Postgraduate Medicine* **55**(1), 65-68.

BIGGS, C.E., FRAMATICO, P.M.(1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 846–849.

BLACK, W.D., CLAXTON, J. & ROBINSON, G.A. (1982). Study of serum drug levels in calves following intramuscular administration of three tetracycline drug preparations. *Canadian Veterinary Journal* **23**, 296-298.

BLACKWOOD, R. K. (1985) Structure determination and total synthesis of the tetracyclines. in Handbook of experimental pharmacology, eds Hlavka J. J., Boothe J. H. (Springer-Verlag KG, Berlin, Germany), **78**:59–136.

BLAIS, J. & CHAMBERLAND, S. (1994) Intracellular accumulation of tilmicosin in primary swine alveolar macrophages. *Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress*, Bangkok, Thailand, pp. 331.

BLANCHFLOWER, W.J., McCracken, R.J. & RICE, D.A. (1989). Determination of chlortetracycline residues in tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst (Cambridge, England)* **114**(4), 421-423.

BLOBEL, H. & BURCH, C.W (1960). Oxytetracycline concentrations in blood serum and milk secretion of cows following intravenous intramammary treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **137**, 701-704.

BODLEY, J.W., ZIEVE, F.J., L. LIN & ZIEVE, S.T. (1969). Formation of the ribosome-G factor-GDP complex in the presence of fusidic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **37**(3): 437-343.

BRETZLAFF, K.N., OTT, R.S., KORITZ, G.D., BEVILL, R.F., SHAWLEY, R.V., GUSTAFSSON, B.K. & DAVIS, L.E. (1982). Distribution of oxytetracycline in the genital tract of cows. *American Journal of Veterinary Research* **43** (1), 12-16.

BRETZLAFF, K.N., OTT, R.S., KORITZ, G.D., BEVILL, R.F., GUSTAFSSON, B.K. & DAVIS, L.E. (1983). Distribution of oxytetracycline in genital tract tissues of postpartum cows given the drug by intravenous and intrauterine routes. *American Journal Veterinary Research* **44**(5), 764-769.

BROWN, S.A., HANSON, B.J., MIGNOT, A., MILLEROUX, L., HAMLOW, P.J., HUBBARD, V.L., CALLAHAN, J.K. & KAUSCHE, F.M. (1999) Comparison of plasma pharmacokinetics and bioavailability of ceftiofur sodium and ceftiofur hydrochloride in pigs after a single intramuscular injection. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**, 35-40.

BRYAN, P.D., HAWKINS, K.R., STEWART, J.T. & CAPOMACCHIA, A.C. (1992). Analysis of chlortetracycline by high-performance liquid chromatography with post column alkaline induced fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* **6**(6), 305-310.

BURCH, D.G.S. (2006). Pharmacokinetics at different levels of the intestinal tract relevant to gut infections in the pig. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* **29** (Supplement 1) 239-301.

BURCH, D.G.S. (2012). Examination of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships of orally administered antimicrobials and their correlation with the therapy of various bacterial and mycoplasmal infections in pigs. Thesis submitted in accordance with the requirements of the Royal College of Veterinary Surgeons for the Diploma of Fellowship.

BURCH, D.G.S., JONES, G.T., HEARD, T.W. & TUCK, R.E. (1986). The synergistic activity of tiamulin and chlortetracycline: in-feed treatment of bacterially complicated enzootic pneumonia in fattening pigs. *Veterinary Record* **119**(5), 108-12.

BURGESS, D.S., FREI, C.R., LEWIS II, J.S., FIEBELKORN, K.R. & JORGENSEN, J.H. (2006). The contribution of pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling with Monte Carlo simulation to the development of susceptibility breakpoints for *Neisseria meningitidis*. *Clinical Microbiology and Infection* **13**(1), 33-39.

BURROWS, G.E., BARTO P.B., MARTIN, B. (1987). Comparative pharmacokinetics of Gentamicin, Neomycine, and Oxytetracycline in newborn calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **10**(1), 54-63.

CALDERÓN, V., DIEZ, P., GONZALEZ, J. & BERENQUER, J.A. (1994). A comparison of homogenization systems for the microbiological assay of tetracycline residues in swine muscle. *Italian Journal of Food Science* **6**(4), 453-458.

CARLSSON, A. & BJORCK, L. (1992). Liquid chromatography verification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assay and the charm II test. *Journal of Food Science* **55**(5), 374-378.

CASALS, J.B., NIELSEN, R. & SZANCER, J. (1990) Standardisation of tiamulin for routine sensitivity of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* (App). *Proceedings of the 11th International Pig Veterinary Society Congress*, Lausanne, Switzerland, p. 43.

CASWELL, A.H. & HUTCHISON, J.D. (1971). Selectivity of cation chelation to tetracyclines: Evidence for special conformation of calcium chelate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **43** (3), 625-630.

CE, Comisión Europea (2015). Comunicación de la comisión. Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04). Diario Oficial de la Unión Europea 7-23.

CETINKAYA, F., YIBAR, A., SOYUTEMIZ, G.E., OKUTAN, A & KARACA, M.Y. (2012). Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part B* **5**(1), 45-49.

CHANG, F.C., CHANG, L.C, CHANG, Y.F., CHEN, M. & CHIANG, T.S. (2002) Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella Choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **14**, 153-157.

CHARM S.E. & CHI, R. (1988). Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **71**(2), 304-316.

CHIESA,L., NOBILE, M., ARIOLI, F., BRITTI, D., TRUTIC, N., PAVLOVIC, R & PANSERI, S. (2015). Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **185**, 7-15.

CHOPRA, I.(1986) Transport of tetracyclines into *Escherichia coli* requires a carboxamide group at the C2 position of the molecule. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **18**, 661-666.

CHOPRA, I.(1994) Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **38**,637–640.

CHOPRA, I., LACEY, R.W., & CONNOLLY, J. (1974). Biochemical and genetic basic of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **6**, 397-404.

CHOPRA, I., HOWE, T.G.B. & LINTON, A.H. (1981). The tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980's. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **8**, 5-21.

CHOPRA, I., HAWKEY, P.M., HINTON, M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **29**, 245–277.

CHOPRA, I., & ROBERTS, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**(2), 232-262.

CHUNG, W.O., YOUNG, K., LENG, Z., ROBERTS, M.C. (1999) Mobile elements carrying ermF and tetQ genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**,329–335.

CIPRIAN, A., DE LA GARZA, M. & PIJOAN, C. (1986). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* in conventional pigs. Proceedings 9th International Pig Veterinary Society Congress, Barcelona, Spain, p. 282.

CLEMENS, E.T., STEVENS, C.E. & SOUTHWORTH, M. (1975). Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine. *Journal of Nutrition* **105**, 759-768.

COHLAN, S.Q., BEVELANDER, G. & TIAMSIC, T. (1963). Growth inhibition of prematures receiving tetracyclines: clinical and laboratory investigation. *American Journal of Disease in Children* **105**, 453-461.

CONNAMACHER, R.H., & MANDEL H.G. (1965). Binding of the tetracycline to the 30S ribosomes and to polyuridylic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **20**, 98-103.

CRAIG., W.A. (1998) Pharmacokinetic/pharmacodynamics parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 11-12.

CRONEBERGER, A.S., KIETMAN, M., EHINGER, A.M., ALLAN, M. & NUERNBERGER, M.C. (2009). Determination of ceftiofur concentration in lung extracellular fluid of pigs by microdialysis and comparison with ceftiofur concentrations in bronchial secretions, lung tissue and blood. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **32** (Suppl. 1), 64-65.

CROUBELS, S., VAN PETEGHEM, C. & BAEYENS, W. (1994). Sensitive spectrofluorimetric determination of tetracycline residues in bovine milk. *Analyst* **119**(12), 2713-2716.

CROWSON, R.D., HEAD, L.H., & FERRATE, W.A. (1976). Esophageal ulcers associated with tetracycline therapy. *Journal of the American Medical Association* **235**, 2747-2748.

DALHOFF, A., AMBROSE, P.G. & MOUTON, J.W. (2009). A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: Deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints. *Infection* **37** (4). 296-305.

DAVEY, L.A., FERBER, M.T. & KAYE, B. (1985). Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and conventional oxitetracycline injection. *Veterinary Record* **117**(17) 426-429.

DAX, S.L.(Ed.) (1997). Quinolone antibacterial. *Antibacterial chemotherapeutic agents* (Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom).

DAY, L.E. (1966). Tetracycline inhibition of cell-free protein synthesis. II. Effect of the binding of tetracycline to the components of the system. *Journal of Bacteriology*. **92**(1), 197-203.

DE JONG, M.F., & OOSTERWOUD, R.A. (1977). Treatment with oxytetracycline hydrochloride in the prevention of atrophic rhinitis in baby pigs. *Tijdschr Diergeneeskd* 102, 266-273.

DE RUYCK, H & DE RIDDER, H. (2007). Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**(9), 1511-1520.

DOERN, G.V., PFALLER, M.A., KUGLER, K., FREEMAN, J. & JONES, R.N. (1998). Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clinical Infectious Diseases* **27**(4), 764-770.

DOWLING H.F. & LEPPER, H.H. (1964). Hepatic reactions to tetracycline. *Journal of the American Medical Association* **188**, 307.

DROUMEV, D., PASHOV, D., DROUMEV, M., VANNGELOV, S., VELIKOVA, E., KANELOV, I., LASHEV, L. & MOUTAFCHIEVA, R (1992). Slow release bolus for small ruminants: in vitro release of tetracycline compared with serum concentrations of the antibiotic in sheep. *Annales de Recherches Veterinaires* **23**, 215-223.

ELSHEIKH, H.A., OSMAN, I.A., & ALI, B.H (1997). Comparative pharmacokinetics of ampicilin trihydrate, gentamicin sulphate and oxytetracycline hydrochloride in Nubian goats and desert sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **20** (4), 262-266.

EMA (2013). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26/EU/EEA countries in 2013. Fifth ESVAC report. EMA/387934/2015

EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1998). Guideline on validation of analytical procedures: methodology. EMEA/CVMP/VICH/563/02-FINAL, London, UK.

ERICSSON, C. D., FELDMAN, S., PICKERING, L. K. & CLEARY T. G. (1982). Influence of salicylate bismuth on absorption of doxycycline. *Journal American Medical Association* **247**, (16) 2266-2267

ERRECALDE, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Utilización de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos para evitar la emergencia de resistencias. P 42. (ISBN 92-5-305150-7 ISSN 1014-1200)

ESCUADERO, E., CARCELES, C. M. & SERRANO, J.M. (1994). Pharmacokinetics of oxytetracycline in goats: modifications induced by a long-acting formulation. *Veterinary Record* **135**(23), 548-551.

EVANS, N.A. (2005) Tulathromycin: an overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Veterinary Therapeutics* **6**, (2), 83-95.

FALKOU, S.(1975) Infectious multiple drug resistance. (Pion Ltd. London, United Kingdom).

FARRINGTON, W.H.H., TARBIN, J., BYGRAVE, J. & SHEARER, G. (1991). Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography/HPLC. *Food Additives and Contaminants* **8**(1), 55-64.

FEY, G., REISS, M. & KERSTEN H. (1973). Interaction of tetracycline with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. A fluorimetric investigation. *Biochemistry* **12**, (6), 1160-1164

FINLAY, A.C., HOBBY, G.L., P'AN, S.Y., REGNA, P.P., ROUTIEN, J.B., SEELEY, D.B., SHULL, G.M, SOBIN, B.A., SOLOMONS, I.A., VINSON, J.W. & KANE, J.H. (1950). Terramycin, a New Antibiotic. *Science* **111**(2874), 85.

FLETOURIS, D.J., PSOMAS, J.E. & BOTSOGLOY, N.A. (1990). Trace analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**(10), 1913-1917.

FOURTILLAN, J.B., INGRAND, I. & MOREAU I. (1989). Biodisponibilités de l'oxytetracycline chez les bovins après administrations intramusculaires de deux formes à libération contrôlée. *Recueil de médecine vétérinaire* **165**(8-9), 727-731.

FRITZ, J.W. & ZUO, Y. (2007). Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **105**, 1297-1301.

GALE, E.F. & FOLKERS (1953). The assimilation of aminoacids by bacteria. XV. Action of antibiotics of nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry Journal* **53**(3), 493-498.

GILLESPIE, M.T., MAY J.W. & SKURRAY, R.(1986) Detection of an integrated tetracycline resistance plasmid in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* **132**, 1723–1728.

GODINHO, K.S., KEANE, S.G. NANJIANI, I.A., BENCHAOUI, H.A., SUNDERLAND, S.J., JONES, M.A., WEATHERLEY, A.J., GOOTZ, T.D. & ROWAN, T.G. (2005) Minimum concentrations of tulathromycin against respiratory bacterial pathogens isolated from clinical cases in European cattle and swine and variability arising from changes in in-vitro methodology. *Veterinary Therapeutics* **6**(2), 113-121.

GOODWIN, R.F.G. (1979). Activity of tiamulin against *Mycoplasma suis* pneumoniae and enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Record* **104**, 194-195.

GOODWIN, R.F.G., HOGSON, R.G., WHITTLESTONE, P. & WOODHAMS, R.L. (1969) Some experiments relating to artificial immunity in enzootic pneumonia. *Journal of Hygiene* **67**, 465-476.

GRIFFIN, D.D. (1979). Experimental oxytetracycline toxicity feedlot heifers. *Bovine Practice* **14**, 37-40.

GROSSMAN, E.R., WALCHEK, A. & FREEDMAN, H (1971). Tetracyclines and permanent teeth. The relation between dose and tooth colour. *Pediatrics* **47**(3), 567-570.

GUERRERO, R.J. (1990) Respiratory disease: An important global problem in the swine industry. *Proceedings of the 11th International Pig Veterinary Society Congress*, Lausanne, Switzerland, pp. 98.

GUTIERREZ-MARTIN, C.B., DEL BLANCO, N.G., BLANCO, M., NAVAS, J. & RODRIGUEZ-FERRI, E.F. (2006) Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology* **115**, 218-222.

GYRD-HANSEN, N., RASMUSSEN, F. & SMITH, M. (1981). Cardiovascular effects of intravenous administration of tetracycline cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **4**, 15-25.

HAAGSMA, N. & MENGELERS, M.J. (1989). A rapid fluorimetric screening method for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in pig meat and kidney tissues. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **188**(3), 227-230.

HALL, W.F., KNIFFEN, T.S., BANE, D.P., BEVILL, R.F. & KORITZ, G.D. (1989). Plasma concentrations of oxytetracycline in swine after administration of the drug intramuscularly and orally in feed. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **194**(9), 1265-1268.

HANNAN, P.C.T., WINDSOR, G.D., DE JONG, A. SCHEMEER, N. & STEGEMANN, M. (1997) Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(9), 2037-2040.

HANSEN, L.H., AARESTRUP, F. & SORENSEN, S.J. (2002). Quantification of bioavailable chlortetracycline in pig faeces using a bacterial whole-cell biosensor. *Veterinary Microbiology* **87**, 51-57.

HASH, J.H., WISHNICK, M. & MILLER P.A. (1964). On the mode of action of the tetracycline antibiotics in staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry* **239**(6), 2070-2078.

HASSELBERGER, M.L. (1991). Modifications to the official method for testing chlortetracycline HCL in animal feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **74**(5), 790-792.

HOFFMANN, H., HARTL, A., HORN, U., KIELSTEIN, P., DREWELLO, J., FOSSBERG, W. & SEUPEL, B. (1983) Antimicrobial activity in tissue of swine, following subcutaneous administration of turimycin. *Archive of Experimental Veterinary Medicine* **37**, 599-607.

HORAUD, T., DE CERSPEDES G., CLERMONT, D., DAVID, F. & DELBOS, F.(1991) Variability of chromosomal genetic elements in streptococci. in Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci. (Eds.) Dunny G. M., Cleary P. P., McKay L. L. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.)

HORSPOOL, L.J.Y & McKELLAR Q.A. (1990). Disposition of oxytetracycline in horses, ponies and donkeys after intravenous administration. *Equine Veterinary Journal* **22**(4), 284-285.

HOWARD, J.L. (1986). Current Veterinary Therapy 2, Food Animal Practice. Philadelphia: W. B. Saunders.

HUBER, W.G. (1977). Tetracyclines, Veterinary Pharmacology and Therapeutics. (Eds.) Jones, L.M., Booth, N.H. & McDonald, L. 4th Ed. The Iowa State University, pp. 929-939.

HUNT, A.D., KELLY, R.S., CORIELL, M.L., MURPHY, S.G., TASHMAN C. & STEVENS C. (1953). Studies on absorption and distribution of Terramycin in children. *Pediatrics* **9**, 607-666.

HYATT, J.M., MCKINNON, P.S., ZIMMER, G.S. & SCHENTAG, J.J. (1995) The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamics surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clinical Pharmacokinetics* **28**, 143–160.

IBAYASHI, T., OKADA, M. & ANDO, N. (1994) Pulmonary concentrations of lincomycin, tylosin, tylvalosin and tiamulin given as feed additives in swine. *Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress*, Bangkok, Thailand, p. 354.

IKAI, Y., OKA, H., KAWAMURA, N., YAMADA, M., HARADA, K. & SUZUKI, M. (1987). Improvement of chemical analysis of antibiotics. XIII. Systematic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **411**, 313-323.

INAMOTO, T., TAKAHASHI, H., YAMAMOTO, K., NAKAI, Y. & OGIMOTO, K. 1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *Journal of Veterinary Medical Sciences* **56**(2), 393-394.

ISAEVA., L.M., & VOEIKOVA, T.A. (1990). Development of the system for protoplast regeneration in *Sterptomyces aureofaciens* strains chlortetracycline producers. *Antibiotiki I Khimioterapiya* **35**(12), 26-29.

IWAKI, K., OKUMURA, N. & YAMAZAKI, M. (1992). Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* **623**,153-158.

KADLEC, K., KEHRENBERG, C. WALLMAN, J., & SCHWARZ, S. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 4903-4906.

KANE, J.H., FINLAY, A.C. & SOBIN B.A. (1950). Antimicrobial Agents from Natural Sources. *Annals of the New York Academy of Sciences* **53**, 227-228.

KAPUSNIK-UNER, J.E., SANDE, M.A., & CHAMBERS, H.F., (1996). Fármacos antimicrobianos: Clortetraciclina, Cloranfenicol, Eritromicina y diversos antimicrobianos en: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (A. G., Goodman, ed), Mc Graw-Hill Interamericana, Mexico DF, 1193-1224.

KARIUKI, S., MIRZA, N.B., WASTESON, Y., SENERWA, D., GATHUMA, J.M., OLSVIK, O.(1992) Tetracycline resistance genes in Kenyan hospital isolates of *Salmonella typhimurium*. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **100**, 629–634.

KAUFMANN, A.F. (1986). Anthrax. In *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice* 2. (Ed.) J. L. Howard. Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 566-567.

KEHRENBURG, C., WERCKENTHIN, C., SCHWARZ, S.(1998) Tn5706, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2116–2118.

KHAN, N.H., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. & VANDERHAEGHE, H. (1987). Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **405**, 229-245.

KIJAT, P.J., LEADBETTER, M.G., THOMAS, M.H. & THOMPSON, E.A. (1991). Confirmation of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in milk by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* **20**(12), 789-795.

KNAPP, J.S., ZENILMAN, J.M., BIDDLE, J.W., PERKINS, G.H., DEWITT, W.E., THOMAS, M.L., JOHNSON S.R., & MORSE S.A. (1987) Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid mediated, high level resistance to tetracycline. *Journal of infectious diseases* **155**(4), 819-822.

KNIFFEN, T.S., BANE, D.P., HALL, W.F., KORITZ, G.D. & BEVILL, R.F. (1989). Bioavailability, pharmacokinetics, and plasma concentration of tetracycline hydrochloride fed to swine. *Journal of Veterinary Research* **50**(4), 518-521.

KONDO, F., MORIKAWA, S. & TATEYAMA, S. (1989). Simultaneous determination of six tetracyclines in bovine tissue, plasma and urine by reverse phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Protection* **52**(1), 41-44.

KORSRUD, G.O. & McNEIL, J.D. (1988). A comparison of three bioassay technique and high performance liquid chromatography for the detection of chlortetracycline residues in swine tissues. *Food Additives and Contaminants* **5**(29), 149-152.

KOWALSKI, C. & POMORSKA, M. (2007). Rapid and validated HPLC assay for the determination of oxytetracycline in biological material. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **51**, 397-400.

KRAMER-HORACZYNSKA, F. (1991). High-performance liquid procedures for the quantitative analysis of 15 tetracyclines derivatives in small blood samples. *Journal of Chromatographic Science* **29**(3), 107-113.

KUNIN, C.M. (1967). A guide to use of antibiotics in patients with renal diseases. A table of recommended and factors governing serum levels. *Annals of Internal Medicine* **67**(1), 151-158.

LAIRMORE, M.D., ALEXANDER, A.F., POWERS, B.E., MILISEN, W.B. & SPRAKER, T.S. (1983). Oxytetracycline associated nephrotoxicosis in feedlot calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **185**(7), 793-795.

LEES, P., CONCORDET, D., ALIABADI, F. S. & TOUTAIN, P. L. (2006) Chapter 5. Drug selection and optimization of dosage schedules to minimize antimicrobial resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Editor Aarestrup, F.M. ASM Press, Washington, DC, USA, pp.49-71.

LEES, P. & SHOJAEE ALIABADI, F. (2002) Rational dosing of antimicrobial drugs: animal versus humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 269-284.

LEES, P., SVENDSEN, O., & WIUFF, C. (2008) Chapter 6. Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Editors Guardabassi, L., Jensen, L.B. and Kruse, H. Blackwell publishing, Oxford, UK, pp.77-101.

LEGGETT, J.E., EBERT, S., FANTIN, B. & CRAIG, W.A. (1991) Comparative dose effect relations at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonitis models. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **S74**, 179-184.

LEVY, S.B., GEORGE, B., FITZGERALD, A.B., & MACONE B.S. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *New England Journal of Medicine* **295**(11), 583-588.

LEVY, S.B. & McMURRY, L. (1978). Plasmid-determines tetracycline resistance involves transport system for tetracycline. *Nature* **276**(2), 90-92.

LEVY, S.B., McMURRY, L.M., BARBOSA, T.M., BURDETT, V., COURVALIN, P., HILLEN, W., ROBERTS, M.C., ROOD, J.I., TAYLOR, D.E.(1999) Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **43**, 1523-1524.

LI, X.Z., LIVERMORE, D.M., & NIKAIDO, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **38**(8), 1732-1741.

LIEBER, C.S., & LEFEBVRE, A. (1959). Ammonia as a source of gastric hypoacidity in patients with uremia. *Journal of Clinical Investigation* **38**, 1271-1277.

LIZARAZO, Y.A., FERRI, E.F., DE LA FUENTE, A.J. & MARTÍN, C.B. (2006). Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004. *American Journal of Veterinary Research* **67**, 663-668.

LOKEN, K.I., WAGNER, W. & HENKE, C.L. (1971). Transmissible drug resistance in enterobacteriaceae isolated from calves given antibiotics. *American Journal of Veterinary Research* **32**(8), 1207-1210.

LONG, A.R., HSIEH, L.C., MALBROUGH, M.S., SHORT, C.H.R. & BARKER, S.A. (1990). Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatography determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **73**(3), 379-384.

LOPES, R.P., REYES, R.C., ROMERO-GONZÁLEZ, R., VIDAL, J.L. & FRENICH, A.G. (2012). Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **1**(3), 39-47.

LYKKEBERG, A.K., HALLING-SORENSEN, B., CORNETT, C., TJORNELUND, J. & HONORÉ HANSEN, S. (2004). Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **34**(2), 325-332.

MADSON, D. (2008). Trends in diagnostic cases: Keeping our eye on the ball. In: *Proceedings of the 2008 American Association of Swine Veterinarians Conference*, San Diego, CA, USA, p. 409.

MALVISI, J., DELLA ROCA, G., ANFOSSI, P. & GIORGETTI, G. (1996). Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture* **147**, 159-168.

MANAVATHU, E.K., FERNANDEZ, C.L., COOPERMAN, B.S. & TAYLOR, D.E. (1990) Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **34**, 71-77.

MARSHALL, B., TACHINANA, C. & LEVY, S.B. (1986). Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**, 835-840.

MARTIN-DE LA FUENTE, A.J., TUCKER, A.W., NAVAS, J., BLANCO, M., MORRIS, S. J. & GUTIERREZ-MARTIN, C.B. (2007) Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* **120**, 184-191.

MARTÍNEZ, E.E. & SHIMODA, W. (1988). Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **71**(3), 477-480.

MATTER, D., ROSSANO, A., LIMAT, S., VORLET-FAWER, L., BRODARD, I. & PERRETEEN, V. (2007) Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitoncillarum*. *Veterinary Microbiology* **122**, 146-156.

MAXWELL, I.H (1968). Studies of the binding of tetracycline to ribosomes *in vitro*. *Molecular Pharmacology* **4**(1), 25-37.

McCRACKEN, R.J., BLANCHFLOWE, W.J., HAGGAN, S.S. & KENNEDY, D.G. (1995). Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in animal tissues using liquid chromatography, post-column derivatation with aluminium, and fluorescence detection. *Analyst* **120**, 1763-1766.

McELROY, D.E., RAVIS, W.R., & CLARK, C.H. (1987). Pharmacokinetics of oxytetracycline hydrochloride in rabbits. *American Journal of Veterinary Research* **48**(8), 1261-1263.

McKELLAR, Q., SANCHEZ, S.F. & JONES, D.G. (2004) Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **27**, 503-514.

McKELLAR, Q., ESCALA, J. & SZANCER, J. (2004) Plasma and tissue kinetic study of tiamulin (Tiamutin) in pigs. In: *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburg, Germany, p. 622.

McNEIL, J.D., KORSRUD, G.O., NAYLOR, J.M. & YATES, W.D.G. (1989). Bioassay techniques and high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracycline residues in tissues from calves. *American Journal of Veterinary Research* **50**(1), 72-74.

MEDIAVILLA, A., AZANZA, J.R., y HONORATO, J. (2008). Macrólidos. Cetólidos. Lincosamidas. Tetraciclinas. Cloranfenicol. Otros antibióticos. En: *Farmacología Humana*. Florez, J., Araujo, J. A., y Mediavilla, A. (Eds.), Elsevier Masson, Barcelona, pp. 1251-1255.

MEIJER, L.A., CEISSENS, K.G., DE JONG, K.T. & GREBE, D.I. (1993). Three phase elimination of oxytetracycline in veal calves; the presence of an extended terminal elimination phase. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **16**(2), 214-222.

MERCER, H.D., TESKE, R.H., LONG, P.E., SHOWALTER, D.H. (1978). Drug residues in food animals. Plasma and tissue kinetics of oxytetracycline in young cross bred swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **1**, 119-128.

MERLE, A., MANDELL, A. & MANDELL G. L. (1991). Agentes Antimicrobianos (continuación) Tetraciclinas, Cloranfenicol, Eritromicina y agentes antimicrobianos varios, en. Las bases farmacológicas de la terapéutica (M. Panamericana, ed), Mexico D.F., pp. 1083-1109.

MEVIUS, D.J., VELLENGA, L., BREUKINK, H.J. & NOUWS, J.F. (1986). Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets, following intravenous and oral administration. *Veterinary Quarterly* **8**, 274-284.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE (MAGRAMA) (2014). http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionesdelsectorporcinoespanol2014_tcm7-379599.pdf

MITSCHER, L.A. (1978). The chemistry of the tetracycline antibiotics. Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y.

MITSCHER, L.A., SLATER-ENG, B. & SOKOLOSKI, T.D. (1972). Circular dichroism measurements of the tetracyclines IV 5-hydroxylated derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**, 66-72.

MOATS, W.A. (1986a). Determination of tetracycline antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **358**, 253-259.

MOATS, W.A. (1986b). Effect of silica support of bonded reversed-phase columns on chromatography of some antibiotics compounds. *Journal of Chromatography* **366**, 69-78.

MOUROT, D., DELEPINE, B., BOISSEAU, J. & GAYOT, G. (1980). Reversed-phase ion pair chromatography of oxytetracycline, epioxytetracycline and anhidroxytetracycline. *Journal of Chromatography* **190**, 468-488.

MOUTON, J.W., THEURETZBACHER, U., CRAIG, W.A., TULKENS, P.A., DERENDORF, H. & CARS, O. (2008) Tissue concentrations: do we ever learn. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 235-237.

MULDERS, E.J. & VAN DE LAGEMAAT, D. (1989). Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **7**(12), 1829-1835.

NELSON, M.L. (1998). Chemical and biological dynamics of the tetracyclines. *Advances in Dental Research* **12**, 5-11.

NEU, H.C. (1978). A symposium on the tetracycline a major appraisal. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **54**, 141-155.

NIELSEN, P. & GYRD-HANSEN, S. (1996). Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 305-311.

NIELSEN, B.H. & SZANCER, J. (1998) Uptake and intracellular concentration of tiamulin in human polymorphonuclear leukocytes compared with norfloxacin. In: *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*, Birmingham, UK, 3, pp. 241.

NORBROOK LABORATORIES (2015). Oxytetracycline injection 200 (USA). Oxytetracycline 200mg/ml. Antibiotic. Product Datasheet. <http://www.norbrook.com/usa/products/oxytetracycline-injection-200-usa/>

NOUWS, J.F. & VREE T.B. (1983). Effect of injection site on the bioavailability of an oxytetracycline formulation in ruminant calves. *Veterinary Quarterly* **5**(4), 165-170.

OKA, H., MATSUMOTO, H., UNO, K., HARADA, K. I., KADOWAKI, S. & SUZUKI, M. (1985). Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII application of prepacked C₁₈ cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *Journal of Chromatography* **325**, 265-274.

OLIVA, B. & CHOPRA, I.(1992) Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines: further evidence for division of tetracyclines into two classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 876–878.

OLIVA, B., GORDON, G., McNICHOLAS, P., ELLESTAD, G. & CHOPRA, I.(1992) Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **36**, 913-919.

ONJI, Y., UNO, M. & TANIGAWA, K. (1984). Liquid chromatography determination of tetracycline residues in meat and fish. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **67**(6), 1135-1137.

OWEN, L.N. (1963). The effects of administering tetracyclines to young dogs with particular reference to localization of drugs in the teeth. *Archives of Oral Biology* **8**, 715.

PAPICH, M.G., WRIGHT, A.K., PETRIE, L & KORSRID, G.O. (1995). Pharmacokinetics of oxytetracycline administered intravenously to 4 to 5-day old foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 375-378.

PATCHANEE, P., TADEE, P., ARJKUMPA., O., LOVE, D., CHANACHAI, K., ALTER, T., HINJOY., S. & THARAVICHITKUL., P. (2014). Occurrence and characterization of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig industries of northern Thailand. *Journal of Veterinary Science* **15**(4), 529-536.

PETERSEN, P.J., JACOBUS, N.V., WEISS, W.J., SUM, P.E. & TESTA, R.T.(1999) *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a novel glycylicline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **43**, 738–744.

PIJPERS, A. SCHOEVERS, E.J., VAN GOGH, H., VAN LEENGOED, L., VISSER, I.J.R. & VAN MIERT, A. (1990). The pharmacokinetics of oxytetracycline following intravenous administration in healthy and diseased pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **13**, 320-326

PIJPERS, A., SCHOEVERS, E.J., VAN GOGH, H., VAN LEENGOED, L., VISSER, I.J.R., VAN MIERT, A. & VERHEIFDEN, J.H.M. (1991a). The influence of disease on feed and water consumption and on pharmacokinetics of orally administered oxytetracycline in pigs. *Journal of Animal Science* **69**, 2947-2954.

PIJPERS, A., SCHOEVERS, E.J., HAAGSMA, N. & VERHEIJDEN, J.H.M. (1991b). Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline and minocycline in pigs after oral administration in feed. *Journal of Animal Science* **69**(11), 4512-4522.

PIJPERS, A., SCHOEVERS, E.J., VAN LEENGOED, L.A.M.G., KOEMAN, J., VERNOOY, J.C.M. & VERHEIJDEN, J.H.M. (1994). Prophylaxis of pleuropneumonia by oxytetracycline in-feed medication in pigs. *Veterinary Record* **134**(9), 215-218.

PILLOUD, M. (1973). Pharmacokinetic plasma protein binding and dosage of oxytetracycline in cattle and horse. *Research of Veterinary Science* **15**(2) 224-230.

POST, K.W., & SONGER J.G. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe* **10**, 47-50.

PRESCOTT , J.F. & BAGGOT, J.D. (2000). Tetracyclines. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (I. S. U. Press, Ed), Iowa. pp.275-289.

PRIDMORE, A., BURCH, D.G.S. & LEES, P. (2011) Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of tiamulin against field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* **151**, 409-412.

RIOND, J.L., HEDEEN, K.M., TYCZKOWSKA, K. & RIVIERE, E. (1989). Determination of doxycycline in bovine tissues and body fluids by high-performance liquid chromatography using photodiode array ultraviolet-visible detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **78**(1), 44-47.

ROBERTS, M.C.(1994) Epidemiology of tetracycline resistance determinants. *Trends in Microbiology* **2**, 353–357.

ROBERTS, M.C.(1996) Tetracycline resistant determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* **19**, 1–24.

ROBERTS, M.C.(1997) Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. *Ciba Foundation Symposium* **207**, 206–218.

ROBERTS, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* **245**, 195-203

ROGALSKI, W.(1985) Chemical modification of the tetracyclines. In Handbook of experimental pharmacology. Hlavka J.J., Boothe J.H. Springer-Verlag K.G. (Eds.). Berlin, Germany, pp. 179–316.

SALEHZADEH, F., MADANI, R., SALEHZADEH, A., RONKI, N. & GOLCHINEFAR, F. (2006). Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition* **5**(4), 377-381.

SCHEER, M. (1987) Concentrations of active ingredient in the serum and in tissues after oral and parenteral administration of Baytril. *Veterinary Medical Review* **2**, 104-118.

SCHENTAG, J.J. (2000) Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: Studies in human dynamic/kinetic models. *Clinical Infectious Diseases* **31** (Suppl. 2), S40-44.

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

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.

SCHIFFERLI, D., GALEAZZI, R.L., NICOLET, J. & WANNER, M. (1982). Pharmacokinetics of oxytetracycline and therapeutic implications in veal calves. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics* **5**(4), 247-257.

SCHNAPPINGER, D., & HILLEN, W. (1996). Tetracycline: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archive of Microbiology* **165**(6), 359-369.

SCHWARZ, S., ROBERTS, M.C., WERCKENTHIN, C., PANG, Y., & LANCE C. (1998). Tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* From domestic animals. *Veterinary Microbiology* **63**, 217-227.

SHAHID, M.A., SIDDIQUE, M., ABUBAKAR, M., ARSHED, M.J., ASIF, M. & AHMAD, A. (2007). Status of oxytetracycline residues in chicken meat in Rawalpindi/Islamabad area of Pakistan. *Asian Journal of Poultry Science* **1**(1), 8-15.

SHARMA, J.P. & BEVILL, R.F. (1978). Improved high-performance liquid chromatography procedure for the determination of tetracyclines in plasma, urine and tissues. *Journal of Chromatography* **166**, 213-220.

SHILS, M.E. (1963). Renal disease and the metabolic effects of tetracycline. *Annals of Internal Medicine* **58**, 389-408.

SOKOL, J. & MATISOVA, E. (1994). Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *Journal Chromatography A* **669**, 75-80.

SONG, S.O., CHO, M.H., SHIN, K.S., LEE, M.H., RYU, P.D., JEONG, B.G., LEE, S.W. & LEE, H.G. (1994). Simultaneous determination of residual tetracyclines in beef pig meat and chicken meat by high-performance liquid chromatography. *Korean Journal of Veterinary Public Health* **18**(4), 345-352.

SPEER, B.S., SHOEMAKER N.B. & SALYERS A.A. (1992). Bacterial resistance to tetracyclines: mechanisms, transfer and clinical significance. *Clinical Microbiology Review* **5**(4), 387-399.

SHRYOCK, T.R., STAPLES, J.M. & DEROSA, D.C. (2002) Minimum inhibitory concentration breakpoints and disk diffusion inhibitory zone interpretative criteria for tilmicosin susceptibility testing against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* associated with porcine respiratory disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **14**, 389-395.

SIDOLI, L., BARIGAZZI, G., SCHIANCHI, P., RUSSELL, C.H. & RUSSELL, S.B. (1984) Minimum inhibitory concentrations of antibacterial agents against strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* from swine. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinical* **79**(5),703-705.

SIMON, F., SEMJEN, G., DOBOS-KOVACS, LACZAY, P. & CSEREP, T. (1990). Efficacy of enrofloxacin against enzootic pneumonia in swine. In: *Proceedings 11th International Pig Veterinary Society Congress*, Lausanne, Switzerland, pp. 96.

SMITH, H.W., & CRABB, W.E. (1957). The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracycline on the incidence of drug resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of *Bact coli* to other chemotherapeutic agents. *Veterinary Record* **12**, 24-30.

SMITH, H.W. & LOWELL, M.A. (1981). *Escherichia coli* resistant to tetracyclines and to other antibiotics in the faeces of U. K. chickens and pigs in 1980. *Journal of Hygiene* **87**, 477-483

SMITH, H.W. (1975). Persistence of tetracycline resistance in pig *E. coli*. *Nature* **258**, 628-630.

SOMEYA, Y., YAMAGUCHI, A., SAWAI, T.(1995). A novel glycylicycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline, is neither transported nor recognized by the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **39**, 247-249.

STANDIFORD, H.C. (1995). Tetracyclines and chloramphenicol. In: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, 4th ed.* G. L. Mandell, J. E. Bennett y R. Dolin (Eds.), Churchill Livingstone, New York, pp.306-317.

STEIGBIEGEL, N.H., REE C.W. & FINLAN, M. (1968). Susceptibility of common pathogenic bacteria to seven tetracycline antibiotic *in vitro*. *American Journal of Medical Science* **255**, 179-195.

STEPHENS, C.R., CONOVER, L.H., HOCHSTEIN, F.A., REGNA, P.P., PILGRIM, F.J., BRUNINGS, K.J. & WOODWARD, R.B. (1952). Terramycin. VIII. Structure of aureomycin and terramycin. *Journal of the American Chemical Society* **74**(19), 4976-4977.

STEVENSON S. (1980). Oxytetracycline nephrotoxicosis in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176**, 530-531.

STOKER, J., PARKER, R. & SPENCER, Y. (1996) The concentration of tilmicosin in pig serum and respiratory tissue following oral administration with Pulmotil® via the feed at a

level of 400g/tonne. In: *Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress*, Bologna, Italy, p.656.

SUM, P.E., LEE, V.J., TESTA, R.T., HLAVKA, J.J., ELLESTAD, G.A., BLOOM, J.D., GLUZMAN, Y. & TALLY, F.P.(1994) Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**,184–188.

SUM, P.E. & PETERSEN P.(1999) Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylcycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 1459–1462.

SUNDERLAND, J., LOVERING, A.M., TOBIN, C.M., Mc GOWAN, A.P., ROE, J.M. & DELSOL, A.A. (2003). Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 135-137.

TAM, V.H., LOUIE, A., DEZIEL, M.R., LIU, W.G., LEARY, R. & DRUSANO, L. (2005). Bacterial population responses to drug selective pressure: Examination of garenoxacin's effect of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases* **192**, 420-428.

TERHUNE, T.N. & UPSON, D.W. (1989a). Factors affecting the accuracy of the live animal SWAB test for detecting urine oxytetracycline and predicting oxytetracycline residues in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **194**(7), 918-921.

TESKE, R.H., ROLLINS, L.D., CONDON. & CARTER, G.G. (1973). Serum oxytetracycline concentrations after intravenous and intramuscularly administration in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **162**(2), 119-120.

TESTA, R.T., PETERSEN, P J., JACOBUS, N.L., SUM, P.E., LEE, V.J. & TALLY, F. P.(1993) In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylicyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **37**,2270–2277.

THACKER, B., MULKS, M., YAMINI, B. & KREBBIEL, J. (1988) Clinical, immunological, haematological, microbiological and pathological evaluation of a percutaneous intratracheal injection *Haemophilus pleuropneumoniae* challenge model. In: *Proceedings 10th International Pig Veterinary Society Congress*, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 69.

THOMAS, M.H. (1989). Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk by liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **72**(4), 564-569.

THOMSON, T.D., DARBY, J.M., MORAN, J.W., TONKINSON, L.V., BLAIS, J. & CHAMBERLAIN, S. (1994a). Tilmicosin pharmacokinetics in healthy swine. In: *Proceedings 6th European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress*, Edinburgh, Scotland, pp. 53.

THONGKAMKON, P., WORARACH, A., KORTHEERAKUL, K. & CHANSONG N. (2002) In vitro susceptibility test of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antimicrobial agents. In: *Proceedings 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, USA, 2, pp. 44.

TOUTAIN, P.L. (2002). Pharmacokinetics/pharmacodynamics integration in drug development and dosage regimen optimisation for veterinary medicine. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science* **4**(4), 1-25.

TOUTAIN, P.L. (2003) Pharmacokinetics / pharmacodynamics integration in dosage regimen optimization for veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* **26** (Suppl. 1), 1-8.

TOUTAIN, P.L., & RAYNAUD, J.P. (1983). Pharmacokinetics of oxytetracycline in young cattle: comparison of conventional vs long-acting formulations. *American Journal of Veterinary Research* **44**(7), 1203-1209.

TSAI, C.E. & KONDO, F. (1994). Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residue. *Research in Veterinary Science* **56**, 277-283.

UENO, R., UNO, K. & AOKI, T. (1992). Determination of oxytetracycline in blood serum by high performance liquid chromatographic with direct infection. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **573**(2), 333-335.

VAALA, W.E., EHNEN, S.J. & DIVERS, T.J. (1987). Acute renal failure associated with administration of excessive amounts of tetracycline in a cow. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **191**, 1601-1603.

VAN DER WOLF, P.J., ROTHKAMP, A. & BROENS, E.M. (2008). *Staphylococci* and MRSA isolated from pigs with clinical symptoms. In: *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress*, Durban, S. Africa, pp.166.

VAN DUIJKEREN, E., JANSEN, M.D., FLEMMING, S.C., DE NEELING, H., WAGENAAR, J.A., VAN NES, A. & FLUIT, A.C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerging Infectious Disease* **13**, 1408-1410.

VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. (1980). Fever and gastric function. J.M. Lipton (Ed.) *Fever*. Raven Press, New York, pp. 57-70.

VARGAS, M.C., REYES, F.G. & RATH, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry* **117**, 545-552.

VAZQUEZ, D. (1964). The binding of chloramphenicol by ribosomes from bacillus megaterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **15**(5), 464-468.

VERA-LIZARAZO, Y.A., RODRIGUEZ-FERRI, E.F., MARTIN DE LA FUENTE, A.J. & GUTIERREZ-MARTIN, C.B. (2006) Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain 1987-1988 and 2003-2004. *American Journal of Veterinary Research* **67**(4), 663-668.

VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A. & HAESEBROUCK, F. (2004) In-vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(11), 4470-4472.

VICENTE, D. & PEREZ-TRALLERO, E. (2010) Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **28**(2), 122–130.

WAGNER, J.G. (1975). *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications, Inc. Hamilton, Illinois.

WAGNER, J.G. (1976). Linear pharmacokinetic models and vanishing exponential terms, implications in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **4**(5), 395-425.

WALLMANN, J. (2006). Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *International Journal of Medical Microbiology* **296** (Suppl. 41), 81-86.

WALSH, J.R., WALKER, L.V. & WEBBER, J.J. (1992). Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography* **596**, 215-216.

WASTESON, Y., HOIE, S. & ROBERTS, M. C. (1994) Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology* **41**, 41-49.

WATTANAPHANSAK, S., GEBHART, C, SINGER, R, & DAU D. (2007). *In vitro* of antimicrobial agents for *Lawsonia intracelullaris*. In: *Proceedings of the 2007 American Association of Swine Veterinarians Conference*. Orlando, Florida, USA, pp. 255-256.

WEISBLUM, B., & DAVIES, J. (1968). Antibiotics inhibitors of bacterial ribosome. *Bacteriology Review*. **32**(4), 493-528.

WHITE, C.R., MOATS, W.A. & KOTULA, K.L. (1993). Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk. *Journal of the Association of Academic International* **76**(3), 549-554.

WRIGHT, C.S. & TSCHAN, D.N. (1953). Local oxytetracycline (terramycin) therapy of skin infections. *AMA Archives of Dermatology and Syphilology* **67**(2), 125-8.

XIA, W., GYRD-ARLINGTON, N. & NIELSEN, P. (1983). Comparisson of pharmacokinetic parameters for 2 oxytetracycline preparations in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **6**(2), 113-120.

YAMAMOTO, K., KIJIMA, M, YOSHIMURA, H. & TAKAHASHI, T. (2001). Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **48**, 115-126.

YAMAOKA, F., NAKAGAWA, T. & UNO, T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **6**(2), 165-75.

YODER, H.W., & PACKER, R.A. (1954). Bovine serum concentration of terramycin (Oxytetracycline) following intravenous and intramuscularly administration. *American Journal of Veterinary Research* **15**(56), 412-416.

YOSHIDA, K. & KONDO, F. (1994). Simplified classification method of residual antibiotics by microbiological assay using drug resistant bacteria. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **35**(5), 543-547.

YOSHIMURA, H., ISHIMARU, M., ENDOH, Y.S. & KOJIMA, A. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **48**, 555-560.

ZHOU, J., XUE, X., LI, Y., ZHANG, J., CHEN, F., WU, L., CHEN, L. & ZHAO, J. (2009). Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propels by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chemistry* **115**, 1074-1080

ZIV, G. & SULMAN, F.G. (1974). Analysis of pharmacokinetics properties of nine tetracycline analogues in dairy cows and ewes. *American Journal of Veterinary Research* **35**(9), 1197-1201.

ZURHELLE, G., PETZ, M., MUELLER-SEITZ, E & SIEWERT, E. (2000). Metabolites of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline and their distribution in egg White, egg yolk, and hen plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(12), 6392-6396.