

Bases Farmacocinéticas/Farmacodinámicas de los Antimicrobianos Utilizados para el Tratamiento de la Mastitis en Busca de Maximizar la Eficacia

Nora Mestorino

Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata
La Plata, Buenos Aires, Argentina

Introducción

La mastitis en vacas lecheras es un problema mundial asociado a la alta producción, que da lugar a cuantiosas pérdidas económicas. Si bien un buen manejo del tambo es fundamental en la disminución de esta afección, los antibióticos siguen siendo una herramienta esencial, y su uso racional una necesidad imprescindible. Es nuestro deber, desde la Academia, concientizar a todos los actores involucrados (productores, técnicos, médicos clínicos, consumidores) en que las infecciones resistentes a los antibióticos son un problema de salud pública a nivel mundial que nos afecta a todos y a las generaciones venideras. Como resultado de la resistencia emergente tanto en bacterias Gram+ como Gram-, los patógenos que permanecen susceptibles a gran parte de los antibióticos actualmente disponibles están disminuyendo y hay pocos antibióticos en desarrollo para hacer frente a estas bacterias resistentes a múltiples drogas (MDR, en inglés). También debemos comprender que producir leche de buena calidad no solamente importa por su impacto en la salud pública, sino que es un factor que estabiliza el desarrollo socio-económico en áreas rurales, particularmente en los países en desarrollo.

La aplicación de la terapia antimicrobiana (ATM) en bovinos productores de leche, similar a la de otras especies animales, a menudo se fundamenta en la experiencia clínica y en consideraciones teóricas más que en ensayos clínicos bien conducidos. Sin embargo, la selección de la misma debería tener en cuenta varios factores. La susceptibilidad de los patógenos al agente antimicrobiano es de fundamental importancia. A este factor se deben sumar las propiedades farmacocinéticas (PK, en inglés) y farmacodinámicas (PD, en inglés) del fármaco. Por lo cual las estrategias de dosificación, considerando la farmacodinamia de los ATMs integrada a su farmacocinética (PK/PD), permiten maximizar la eficacia terapéutica, contener el avance y la diseminación de cepas bacterianas resistentes; obteniendo productos de origen animal destinados al consumo del hombre de alta calidad (Mestorino, 2011; Mestorino y Errecalde, 2012).

Conceptos Farmacocinéticos

La eficacia de la terapia ATM en la mastitis depende de varios factores, tales como el tipo de principio químico utilizado, la dosis empleada, la vía de administración, la calidad de la formulación y la duración del tratamiento entre otros factores (Ziv, 1980; Mestorino, 2011; Mestorino y Errecalde, 2012). La vía de administración, la forma de dosificación y la dosis derivan de estudios PK. La farmacocinética describe la disposición de los fármacos en el organismo de una manera gráfica o matemática. El perfil concentración en función del tiempo de un fármaco en sangre o tejidos dependerá entonces indefectiblemente de la dosis, absorción desde el sitio de administración, distribución dentro del organismo y eliminación por procesos metabólicos o de excreción. En el tratamiento de las infecciones bacterianas, es importante que una concentración efectiva del fármaco ATM llegue con rapidez al foco de la

infección y se mantenga por un tiempo adecuado. La concentración obtenida depende de la disponibilidad sistémica del fármaco, la cual varía con la forma posológica (preparación del fármaco) y vía de administración, la frecuencia de dosis y capacidad del fármaco para ingresar en el sitio de infección. La naturaleza química y propiedades fisicoquímicas (liposolubilidad, pK y grado de ionización) del agente ATM influyen en la extensión y magnitud de la absorción (disponibilidad sistémica), en el patrón de distribución y velocidad de eliminación. La localización de la infección puede tener enormes influencias sobre la concentración del fármaco obtenida, ya que algunos sitios, como por ejemplo el sistema nervioso central, están protegidos por barreras celulares impermeables que impiden la penetración del fármaco, mientras que otros como la glándula mamaria tienen barreras más permeables (barrera hemato-mamaria) y pH locales que pueden favorecer la acumulación del fármaco (bases orgánicas liposolubles administradas por vía sistémica).

El grado en el que un medicamento tiene acceso a la leche, cuando es administrado en forma sistémica, o bien el grado en el que se absorbe y se distribuye por la glándula mamaria cuando es administrado en forma local o intramamaria (IMM); dependerá de sus principales propiedades físico-químicas: peso molecular, solubilidad en lípidos, grado de ionización, y nivel de adhesión a proteínas séricas y de la ubre, propiedades que determinarán su comportamiento PK ulterior. En lo que concierne a las preparaciones IMM, el tipo de vehículo utilizado será decisivo (Mestorino y Errecalde, 2012; Mestorino *et al.*, 2018). Las bases orgánicas débiles (macrólidos), tienden a acumularse en la leche en su forma ionizada luego de la administración parenteral, alcanzando concentraciones más elevadas que las sanguíneas, mientras que los ácidos débiles (β -lactámicos) presentarán un menor grado de ionización en la leche, cuyo pH es inferior al plasmático, lo que redundará en una mayor difusión desde la glándula al resto del organismo (Mestorino y Errecalde, 2012).

Conceptos Farmacodinámicos

Las propiedades farmacodinámicas incluyen la concentración versus tiempo en los tejidos y otros líquidos corporales, efecto toxicológico, concentración versus tiempo en el sitio de infección, y efectos ATMs en el foco infeccioso. Los efectos antimicrobianos farmacodinámicos en el sitio de la infección comprenden la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM), efecto destructivo dependiente de la concentración, efecto de primera exposición, efecto posantibiótico (EPA), efecto sub-CIM (ESC) y efecto de potenciación leucocitaria posantibiótico (EPL) (Mestorino, 2003). Recientemente se ha introducido una nueva hipótesis que incorpora un concepto novedoso denominado concentración preventiva de mutantes (CPM) (Drlica y Zhao, 2007). Esta hipótesis sostiene que las subpoblaciones mutantes resistentes presentes en el sitio de infección, previo al momento del inicio de la terapia con ATMs, se enriquecen y amplifican cuando las concentraciones del ATM caen dentro de la ventana selectiva de mutantes (VSM) (Drlica y Zhao, 2007). Otros factores, de igual importancia, incluyen las defensas inmunes; y funciones renal y hepática del huésped.

Muchas preparaciones antibióticas tienen unos cuantos años, esto significa que cuando fueron lanzadas al mercado, los requisitos para su autorización no contemplaban los criterios actuales requeridos para realizar los estudios PK en los animales de destino y menos aún las pautas PK/PD. De manera que además de las consideraciones PK, debemos poner especial atención a la PD, que estudia las interacciones entre la bacteria y el ATM; dando soporte a

los estudios PK para determinar las dosis óptimas de los ATMs. Estos estudios consideran la “relación existente entre una *bacteria* en particular con un *antimicrobiano* en particular en un *paciente* particular”.

En una ubre infectada la bacteria puede estar libre en la leche, adherida a la superficie celular, dentro de las células del hospedador o puede ocurrir como una infección del tejido conectivo. Por ejemplo, las mastitis por estreptococos o coliformes son usualmente infecciones del compartimento blanco (leche) de la ubre, por lo que debemos utilizar una sustancia que se acumule en el espacio extracelular y no en las células. Tales sustancias incluyen a los β -lactámicos. En cambio los estafilococos pueden residir tanto en el espacio intercelular, dentro de células epiteliales o en células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), a donde no pueden llegar fácilmente los agentes β -lactámicos. Así estas infecciones deben ser tratadas con ATMs que sean capaces de penetrar en las células y tejidos del animal (Mestorino y Errecalde, 2012).

¿Cuál es la dosis correcta?

Una terapia antibiótica inapropiada a menudo es resultado de una administración demorada o, más frecuentemente, de una subestimación de las tendencias actuales sobre resistencia. Independientemente de esto, la clasificación de un microorganismo como “sensible”, “intermedio”, o “resistente” no es suficientemente informativo para determinar la dosis ideal que debe usarse para tratar la infección. En cambio, debiera usarse el término “terapia antibiótica óptima” para indicar no sólo que se ha elegido el antibiótico correcto sino también que la dosis es suficiente para obtener el máximo umbral de exposición determinado por los estudios PD.

Conceptos Farmacocinéticos/Farmacodinámicos

El objetivo de la interacción PK/PD es establecer un protocolo terapéutico racional que permita optimizar la utilización de los ATMs para maximizar la eficacia clínica y bacteriológica, minimizando la selección de cepas resistentes. La Agencia Europea para la evaluación de productos medicinales (*European Medicinal Agency* (EMA), 2016) considera que la integración PK/PD tiene gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos y en la reevaluación de aquellos ya existentes.

Históricamente un régimen de dosificación era determinado solamente por parámetros PK, sin embargo hoy se sabe que la PD juega también, un rol muy importante. Es decir, la eficacia de los ATMs *in vivo*, depende de su perfil PK como también de las propiedades PD de los mismos. Las concentraciones tisulares y en los fluidos orgánicos determinan los efectos farmacológicos y toxicológicos, mientras que la concentración en el sitio de infección determina el efecto ATM. De esta manera la aplicación de modelos PK/PD, conjuntamente con una apropiada elección de una enfermedad natural puede proveer información relevante para el desarrollo de nuevas formulaciones y para el diseño e implementación de nuevos planes terapéuticos.

La interacción PK/PD permite relacionar los datos de la actividad microbiológica de un ATM con el perfil PK del mismo. La curva concentración en función del tiempo del antimicrobiano se determina en función de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la bacteria y los parámetros PKs son expresados en función de la misma. De esta manera, se fijan las pautas posológicas para estos fármacos y los puntos de corte que determinan la

sensibilidad o resistencia de los distintos patógenos. Así, han sido establecidos tres parámetros PK/PD básicos (Ahmad *et al.*, 2016) a partir de relacionar la CIM con:

- La concentración libre máxima observada ($fC_{\text{máx}}/CIM$),
- El área bajo la curva concentración libre de antimicrobiano en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 horas ($fABC_{0-24h}/CIM$) y
- El porcentaje de tiempo del intervalo inter-dosis durante el cual la concentración antimicrobiana libre permanece sobre la CIM ($fT > CIM$)

El mecanismo de acción de cada familia de ATMs determina una cinética de acción específica. Por lo tanto y de acuerdo al criterio PD, los ATMs se clasifican en agentes cuya actividad bacteriológica es tiempo-dependiente o concentración-dependiente. Es decir, las características bactericidas ATMs dependen tanto de la concentración del fármaco libre en relación a la CIM como del tiempo durante el cual se mantiene esta exposición (Figura 1) (Craig, 1998).

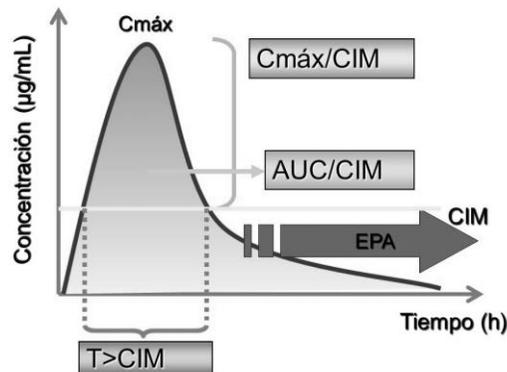


Figura 1. Parámetros PK¹/PD² que gobiernan la eficacia antimicrobiana: $C_{\text{máx}}^3/CIM^4$, ABC_{0-24h}^5/CIM y $T^{6>CIM}$.

¹Propiedades farmacocinéticas; ²Propiedades farmacodinámicas;

³Concentración máxima ⁴Concentración inhibitoria mínima;

⁵Área bajo la curva; ⁶Tiempo (Fuente: Modificada de Craig, 1998).

Para los ATMs cuya acción bacteriológica es tiempo-dependiente, el parámetro PK/PD que mejor se correlaciona con la eficacia es el $fT > CIM$. Cuando se utiliza este tipo de compuestos, la optimización del tratamiento se basa en ajustar los intervalos inter-dosis para lograr que la concentración ATM en el sitio de la infección no caiga por debajo de la CIM. Para los compuestos cuya acción bacteriológica es concentración-dependiente, los parámetros $fABC_{0-24h}/CIM$ o $fC_{\text{máx}}/CIM$ son los que mejor predicen la eficacia. La optimización del $fABC_{0-24h}/CIM$ se basa esencialmente en adaptar la dosis diaria total, que es la que gobierna el ABC_{0-24h} . El parámetro $fC_{\text{máx}}/CIM$ depende de la cantidad administrada en la primera dosis. En el sitio de infección, la $C_{\text{máx}}$ depende a su vez de la cantidad relativa de la dosis administrada que alcanza el mismo y de la velocidad a la cual discurre su acceso.

Una clasificación más compleja involucra al efecto persistente. Hablamos de efectos persistentes cuando los ATMs frente a un determinado microorganismo y habiéndose alcanzado los predictores de eficacia enunciados anteriormente, presentan EPA, ESC y EPL. Los ATMs cuya acción es concentración-dependiente presentan generalmente EPA y ESC considerables. La supresión persistente del crecimiento bacteriano que sigue a la exposición de las bacterias a los ATMs se denomina EPA y es una de las características PDs más relevantes para la optimización de los regímenes terapéuticos. El EPA ha sido demostrado para un número de compuestos entre los cuáles se destacan los aminoglucósidos, la rifampicina, las fluoroquinolonas, los macrólidos de última generación y las tetraciclinas. El fundamento del EPA es que la unión del ATM a las estructuras bacterianas desencadena una serie compleja de alteraciones ultraestructurales que afectan la morfología y funcionalidad enzimática normal. Como consecuencia de estos cambios, las bacterias supervivientes no recobran su funcionamiento normal hasta pasado un tiempo más o menos largo. El ESC es aquel por el cual las concentraciones inferiores a la CIM producen retrasos en el crecimiento de las bacterias y afectan la expresión de algunos de sus factores de virulencia. Por último, el EPL es aquel por el cual las bacterias tratadas con ATMs son más sensibles a la fagocitosis y destrucción por parte del sistema inmune.

Han sido establecidos los parámetros PK/PD que mejor predicen la eficacia clínica y la prevención de la selección de cepas resistentes para un gran número de ATMs, pero aún falta mucho por recorrer y comprobar. De manera que en base a las pautas PK/PD, los ATMs actualmente se clasifican en tres grandes grupos: i) antimicrobianos acción bactericida dependiente de la concentración con prolongado efecto de persistencia, ii) antimicrobianos acción dependiente del tiempo de contacto con escasa o nula persistencia y iii) antimicrobianos acción dependiente del tiempo de contacto con prolongada persistencia (Tabla 1). En el primer grupo encontramos a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, con los que una concentración de 10-12 veces la CIM para el microorganismo blanco, en el sitio de la infección, incrementa notablemente la eficacia y reduce la selección de cepas resistentes. Por lo tanto en este grupo debemos optimizar las concentraciones administradas en cada dosificación. En el segundo grupo, penicilinas y macrólidos clásicos, para los cuales la eficacia depende fundamentalmente del tiempo durante el cual la concentración del ATM en el sitio de infección excede la CIM, siendo muy importante comprender este concepto, ya que muy altas concentraciones no incrementarán la eficacia del producto, muy por el contrario pueden aparecer efectos paradójicos. Finalmente dentro del tercer grupo, encontramos a los macrólidos de última generación – tulatromicina-, tetraciclinas, en los cuales la eficacia está relacionada con la cantidad de ATM disponible en el sitio de infección, por lo cual los parámetros predictores de eficacia son $fABC_{0-24h} / CIM$ y $fT > CIM$ (Mestorino y Errecalde, 2012; Ahmad *et al.*, 2016).

Microorganismos Intracelulares

A lo dicho debemos agregar la extraordinaria capacidad de supervivencia a nivel intracelular, la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia a múltiples fármacos y los diversos mecanismos de virulencia (como formación de *biofilms*) que presentan algunos microorganismos patógenos como el *Staphylococcus aureus*. El tratamiento antibacteriano frente a microorganismos capaces de mantenerse y prosperar en el medio intracelular o de formar conglomerados de colonias adherentes rodeadas por una matriz de exopolisacáridos, nos enfrenta a un reto de grandes proporciones, ya que las bacterias en estos estados son especialmente refractarias a los

mecanismos inmunes (humorales y celulares). Estas infecciones no solo son perjudiciales para el hospedador, sino que constituyen una verdadera fuente de reserva para infecciones recurrentes. La pobre acción de los ATMs posibilita la supervivencia de los microorganismos, y se torna en el principal factor predisponente para la selección de cepas resistentes.

Es por esta razón, que con gran frecuencia existen infecciones persistentes por *S. aureus*, que además de perdurar por largos periodos de tiempo en el animal afectado, representan un riesgo potencial en la transferencia de genes de resistencia bacteriana a otros animales, al ambiente inmediato y al hombre. Estas consideraciones nos incitan a desarrollar el conocimiento con miras hacia el control de infecciones intracelulares, tomando como modelo al *S. aureus*, microorganismo incluido en los programas de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos como **bacteria patógena zoonótica emergente** (OIE, 2014).

Tabla 1. Clasificación de los agentes antimicrobianos desde el punto de vista PK¹/PD².

Actividad Bacteriológica	Parámetro PK/PD	Ejemplos
Tiempo- dependiente con EPA nulo a moderado	Porcentaje del intervalo inter-dosis durante el cual la concentración permanece sobre la CIM ³ ($fT^4 > CIM$)	Cefalosporinas Macrólidos tradicionales, Penicilinas
Tiempo- dependiente con EPA prolongado	Área bajo la curva sobre la CIM en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 horas ($fABC^5_{0-24h}/CIM$)	Clindamicina Pirlimicina, Tetraciclina Ansamidas
Concentración dependiente con EPA prolongado	Área bajo la curva sobre la CIM en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 h ($fABC_{0-24h}/CIM$) y Concentración máxima sobre la CIM ($fC^6_{máx}/CIM$)	Aminoglucósidos Fluoroquinolonas

¹Propiedades farmacocinéticas; ²Propiedades farmacodinámicas; ³Concentración inhibitoria mínima; ⁴Tiempo; ⁵Área bajo la curva; ⁶Concentración máxima.

Las diferencias tanto de hospedadores como de bacterias, el estado inmunitario, la localización de la bacteria (particularmente intracelular) y determinados factores de virulencia de la misma afectarán la relación PK/PD. Esta relación calculada con concentraciones plasmáticas no suministra predicciones precisas de eficacia en situaciones tales como lo es la mastitis estafilocócica. En este caso, las concentraciones de ATM en el compartimiento mamario, y particularmente a nivel subcelular, son muy diferentes a las del plasma y por otra parte, la actividad de los ATMs puede ser además, afectada por el ambiente ácido del fagolisosoma.

Si bien la CIM es fundamental, como mencionamos, para establecer los predictores de eficacia, debemos comprender que es un parámetro PD estático que nos proveerá solo una limitada información acerca de la actividad de un agente antibacteriano, ya que:

- La CIM no aporta información acerca de la velocidad de la actividad antibacteriana (Craig, 1998). La velocidad de muerte bacteriana difiere según el tipo de mecanismo de

acción de los antibióticos, existiendo diferencias notables entre la provocada por agentes bactericidas y bacteriostáticos.

- La CIM no provee información acerca de la persistencia de la actividad antibacteriana luego que la exposición del microorganismo al antibiótico ha cesado (EPA) (Craig, 1998).
- La CIM, al referirse a una concentración constante de ATM, solo aporta información PD de tipo cualitativa, ya que hace referencia a una respuesta de tipo todo (concentración mayor a CIM) o nada (concentración menor a CIM) (Craig, 1998).

De manera que la CIM por sí sola, no refleja totalmente el contexto *in vivo*, en donde las bacterias no están expuestas a una concentración constante de antibacteriano sino que esta cambia en función del tiempo transcurrido desde su administración, como consecuencia de los procesos de absorción, distribución, eliminación y excreción. Una de las metodologías empleadas para subsanar este inconveniente, es el estudio de las curvas de muerte bacteriana. En estas la evolución de una población bacteriana en función del tiempo y en ausencia de antibacteriano son comparadas con las curvas obtenidas en presencia de un antibiótico (Craig, 2002).

La actividad de un antibiótico sobre una población de gérmenes también varía en función de factores tales como concentración y tiempo del agente antibacteriano en contacto con la bacteria y variaciones del pH del medio (Mestorino y Errecalde, 2012). Así mismo, la cinética de muerte bacteriana en condiciones *in vitro* es modificada (aumentada o disminuida) por variaciones del pH, siendo esta una variable que se debe considerar para simular las condiciones *in vivo*, ya que se establecen gradientes de pH entre el interior celular y el entorno extracelular (desde 5 en los fagolisosomas, 6,5 en el citosol o 7,4 en el exterior), o bien el medio en donde se encuentran las bacterias puede ser modificado a causa de diversas alteraciones tisulares (tejidos inflamados o presencia de material necrótico) provocadas por el mismo agente infeccioso. El *S. aureus* se presenta como un verdadero desafío por su capacidad de penetrar a nivel intracelular, donde sobrevive por largos períodos de tiempo e inclusive se reproduce, y desarrolla diversos mecanismos para evadir la acción antimicrobiana. El entender la dinámica intracelular nos permitirá desarrollar protocolos terapéuticos, más eficaces que beneficien a todos los actores involucrados en esta problemática.

Actualmente se reconocen más de 137 microorganismos relacionados con la mastitis, dentro de los cuales los géneros *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp., continúan siendo responsables de más del 90 % de las infecciones. La fisiopatología relacionada con la infección producida por dichos patógenos hace que ésta se manifieste frecuentemente como mastitis subclínica. Este tipo de infección comúnmente es de larga duración, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche, afecta adversamente la calidad de la misma, puede servir como reservorio para infectar a otros animales en el rodeo como así también al hombre y fundamentalmente es difícil de tratar con antimicrobianos, tornándose recurrente.

El hábitat primario del *S. aureus* es la piel de la glándula mamaria y/o las lesiones del pezón, de manera que el principal reservorio es la ubre infectada, donde los microorganismos están adaptados a sobrevivir y crecer. Esta bacteria es capaz de sobrevivir en células alveolares, neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria bovina durante un tiempo prolongado. Tiene la capacidad de multiplicarse en el interior de las vacuolas citoplasmáticas de la célula alveolar,

usando como propio el citoesqueleto membranoso de la célula hospedadora. También, puede adoptar “formas L” que, al no poseer pared celular, resiste a los agentes antibacterianos que actúan sobre los componentes de la pared bacteriana. Por otra parte, tiene la capacidad de formar una cápsula de características lipoproteicas (proteína A) e hidrofóbicas que dificulta la fagocitosis y constituye el principal factor de infecciosidad y supervivencia en la ubre. Finalmente, en el entorno intracelular, *S. aureus* puede cambiar a un fenotipo conocido como variantes de colonia pequeña (SCV) que les proporciona ventajas marcadas para la supervivencia, como anaerobiosis e índice de crecimiento reducido. De hecho, el SCV demuestra un número de características que son atípicas a *S. aureus* y vinculadas a la interrupción de transporte de electrones; también presentan sensibilidad antibiótica modificada. El SCV es auxótrofo, puede volver al crecimiento y a la morfología normal en presencia de menadiona y hemina, tiamina, o en un medio de cultivo rico en CO₂ (von Eiff *et al.*, 2006). Características por demás alarmantes del riesgo que implica el fracaso terapéutico aplicado para su erradicación del rodeo afectado.

Conclusiones

Es indiscutible que los ATMs constituyen la herramienta más utilizada para el control de la mastitis bovina. El abuso y mal uso de los mismos ha llevado a la aparición de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana y lo que es peor aún, a la diseminación de determinantes de resistencia bacteriana entre animales, el hombre y el medio ambiente. Así, comienza una presión selectiva sobre microorganismos patógenos y comensales que induce la aparición de cepas resistentes, ocasionando nuevamente fracasos terapéuticos y la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. La erradicación completa de la resistencia bacteriana es un imposible, pero si es factible contenerla a través del ***uso prudente de los ATMs***, considerando las pautas PK/PD expuestas anteriormente. ***Preservar la eficacia de los mismos es fundamental para que la producción bovina siga siendo una actividad rentable y sostenible en el futuro.***

Referencias

1. Ahmad, I., L. Huang, H. Hao, P. Sanders, and Z. Yuan. 2016. Application of PK/PD modeling in veterinary field: Dose optimization and drug resistance prediction. *BioMed Research International*, Article ID 5465678, 12 pages. doi:10.1155/2016/5465678.
2. Craig, WA. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 26:1-10.
3. Craig, W.A. 2002. The role of pharmacodynamics in infective treatment of community-acquired pathogens. In *Proceedings of 39th Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America. Advances Studies in Medicine.* 2:126-134.
4. Drlica, K. and Zhao, X. 2007. Mutant Selection Window Hypothesis Updated. *Clin Infect Dis.* 44:681-688.
5. European Medicines Agency, EMA. 2016. Guideline for the demonstration of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances. EMA/CVMP/627/2001-Rev.1
6. Mestorino, N. 2003. Uso racional de antimicrobianos en animales de compañía. Páginas 18-23. En *Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria -X Latinoamericanas - XV Nacional.* La Plata, Buenos Aires, Argentina.
7. Mestorino, N. 2011. Uso de antimicrobianos en grandes animales y en alimentos agropecuarios y su implicancia en humanos. Páginas 24-30. En Documento final "La