

Actividad antibacteriana *in vitro* de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*: efecto del suero bovino y tamaño del inóculo

In vitro antibacterial activity of ciprofloxacin on *Escherichia coli*: effect of bovine serum and inoculum size

Baroni, E.¹; Russi, N.²; Rubio, M.³; Picco, E.¹; Formentini, E.¹

¹Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. ²Laboratorio de Microbiología del Hospital de Salud Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. ³Cátedra de Semiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

RESUMEN

Los ensayos *in vitro* utilizados para evaluar la actividad de los antimicrobianos no tienen en cuenta la respuesta inmune del paciente, la cual es necesaria para la resolución exitosa de la enfermedad infecciosa. En este estudio evaluó *in vitro* el efecto del suero bovino y la concentración bacteriana en la actividad de ciprofloxacina sobre una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Las concentraciones inhibitorias mínimas en caldo Mueller Hinton y en presencia de suero bovino fueron de 0,0188 y 0,0047 µg/ml respectivamente, mientras que el valor de la concentración preventiva de mutantes estimada en agar Mueller Hinton fue de 0,60 µg/ml. En los ensayos de curvas de muerte bacteriana construidos en caldo Mueller Hinton, ninguna concentración logró una eficacia del 99,9% (efecto bactericida) al final del ensayo, mientras que en presencia de suero bovino la actividad bactericida se incrementó en forma directa con el incremento de las concentraciones, logrando eficacias del 99,9% (efecto bactericida) y del 99,99% (efecto de erradicación bacteriana). En el ensayo de curva muerte construida en caldo Mueller Hinton en presencia de una elevada densidad bacteriana, ninguna concentración logró una reducción en el número de bacterias viables compatible con un efecto bactericida. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la eficacia óptima de ciprofloxacina sobre la cepa de *Escherichia coli* fue condicionada por la carga bacteriana y los factores de respuesta inmune presentes en el suero.

Palabras clave: (ciprofloxacina), (suero bovino), (densidad bacteriana), (curvas de muerte)

Correspondencia *e-mail*: Enrique Formentini eforment@fcv.unl.edu.ar

Recibido: 30-06-2014

Aceptado: 07-11-2014

SUMMARY

The *in vitro* assays used to evaluate the activity of antibacterial drugs do not consider the patient immune response, which is necessary for the successful recovery from infectious disease. In this study the effect of the bovine serum and the bacterial concentration on the activity of ciprofloxacin on a strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) was evaluated *in vitro*. The minimum inhibitory concentrations on Mueller Hinton broth and in presence of bovine serum were 0.0188 and 0.0047 µg/ml respectively, while the value of the mutant prevention concentration estimated on Mueller Hinton agar was 0.60 µg/ml. In the time-killing curve constructed on Mueller Hinton broth, no concentration achieved an efficacy of 99.9% at the end of the assay, whereas in presence of bovine serum the bactericidal activity increased directly with the increasing concentrations, attaining efficacy values of 99.9% (bactericidal effect) y del 99,99% (bacterial eradication). No concentrations reduced the viable bacteria at levels of bactericidal effect when the time-kill curves where constructed in Muller-Hinton broth. The results obtained in this study showed that the optima efficacy of ciprofloxacin on *Escherichia coli* depends on the inoculum size ant the factors of the immune response present in bovine serum.

Key words: (ciprofloxacin), (bovine serum), (bacterial concentration), (time-kill curve)

INTRODUCCIÓN

Los ensayos de laboratorio utilizados para evaluar la eficacia de los antibióticos como: determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), efecto posantibiótico y construcción de curvas de muerte entre otros, no permiten valorar el impacto de los factores de respuesta inmune del individuo sobre la actividad del antibiótico, de manera que la eficacia resultante equivale a la que se observaría en un paciente inmunosuprimido²⁰. Al mismo tiempo, estos ensayos se realizan utilizando concentraciones estandarizadas de bacterias normalmente $0,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), lo que muchas veces no refleja el tamaño de la población bacteriana presente en un foco infeccioso². Los ensayos de CIM y de curvas de muerte realizados en presencia de suero, simulan una situación más próxima a la que se observaría en un organismo viviente, permitiendo evaluar la interacción entre el antibiótico, la bacteria y ciertos componentes de la respuesta inmune presentes en el suero, como los anticuerpos naturales (AcN) y el complemento¹³. Estos dos factores interactúan en el proceso de eliminación

de microorganismos, ya que los AcN actúan como moléculas de reconocimiento opsonizando a estos, iniciando la cascada de activación del complemento y culminando con la lisis bacteriana¹⁷.

Ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas (FQs) que ha demostrado ser efectivo contra una amplia variedad de infecciones tanto en animales como en humanos¹⁰. Al igual que el resto de las FQs, ciprofloxacina presenta actividad bactericida dependiente de la concentración, por lo que la óptima eficacia de la misma se obtiene con la administración de dosis que garanticen elevadas concentraciones durante un corto tiempo⁷. Todas las FQs exhiben gran actividad sobre enterobacterias y otras bacterias Gram negativas, presentando también alguna actividad sobre ciertos cocos Gram positivos³. Todos estos compuestos presentan una excelente actividad *in vitro* sobre *Escherichia coli*, que es una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en infecciones del tracto digestivo en bovinos⁶ y es el agente etiológico de septicemias e infecciones del tracto respiratorio en animales¹². El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto del

siero bovino (SB) y la concentración bacteriana en la actividad de ciprofloxacina sobre una cepa de referencia de *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y Antibiótico

La bacteria utilizada fue la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, y el antibiótico utilizado fue un estándar de ciprofloxacina (Sigma-Aldrich® Argentina) de pureza conocida (98,3%).

Suero bovino (SB)

El SB fue obtenido a partir de muestras de sangre venosa de varios bovinos adultos y sanos que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los tres meses previos a la extracción. La esterilidad del pool de sueros fue testada mediante procedimientos bacteriológicos clásicos.

Preparación de los inóculos

La preparación de un inóculo estándar ($0,5 \times 10^6$ UFC/ml) se realizó según el procedimiento descrito por García Rodríguez *et al.* (2001)⁸, en tanto que un inóculo de alta densidad (1×10^9 UFC/ml) fue preparado siguiendo el procedimiento descrito por Blondeau (2009)¹.

Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM de ciprofloxacina sobre la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se determinó por el método de macrodilución en tubo⁵ en caldo Mueller Hinton (CMH); Britania, Buenos Aires, Argentina y en CMH con SB en proporción 50:50 (CMH/SB). El ensayo fue realizado en las concentraciones comprendidas entre 0,0012 y 0,1500 µg/ml. La CIM fue determinada como la mínima concentración de ciprofloxacina que impidió el desarrollo visible de bacterias. Cada determinación se realizó por triplicado.

Determinación de concentración preventiva de mutantes (CPM)

La CPM de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 se determinó según el procedimiento descrito por Blondeau (2009)¹.

El ensayo fue realizado en las concentraciones comprendidas entre 0,0188 y 1,20 µg/ml. Cada determinación se realizó por triplicado.

Construcción de curvas de muerte

Las curvas de muerte se realizaron según la metodología descrita por García Rodríguez *et al.* (2001)⁸. Se construyeron tres tipos de curvas de muerte: a) ciprofloxacina enfrentada a un inóculo estándar en CMH, b) ciprofloxacina enfrentada a un inóculo estándar en CMH/SB y c) ciprofloxacina enfrentada a un inóculo de alta densidad en CMH (CMH-AD). En el primer caso las concentraciones de ciprofloxacina testeadas fueron equivalentes a 0,25 - 0,5 - 1 - 4 - 8 - 16 y 32 veces el valor de la CIM determinada en CMH, mientras que en el segundo caso las concentraciones testeadas fueron las mismas pero referidas al valor de la CIM estimada en CMH/SB. En el tercer caso, las concentraciones testeadas fueron equivalentes a 0,5 - 1 - 2 - 8 - 16 y 32 veces el valor de la CIM determinada en CMH. Cada curva de muerte se realizó por triplicado. Para la evaluar la velocidad bactericida de diferentes concentraciones de ciprofloxacina, la duración de los ensayos de curva de muerte en CMH y CMH-SB se fijó en cinco horas en base a los ensayos realizados por Zeiler (1985)²² y Chalkley and Koornhof (1985)⁴. En todos los casos el recuento de bacterias viables se realizó a las 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 y 5 horas, siendo el límite de detección de 10 UFC/ml.

Índices de actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana (*E*) se cuantificó cómo la diferencia entre los valores de \log_{10} del número de bacterias viables (UFC/ml) al inicio ($n_{t=0}$) y al final del ensayo ($n_{t=5}$) según la siguiente ecuación: $E = n_{t=5} - n_{t=0}$.

En base a los criterios propuestos por Sidhu *et al.* (2011)¹⁶ para evaluar *E* se utilizaron tres puntos de corte teóricos: a)-*Efecto bacteriostático*: $E = 0$; no hay cambios en valor de $n_{t=0}$; b)- *Efecto bactericida*: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ (99,9%) respecto del \log_{10} de $n_{t=0}$ y c)- *Efecto de erradicación virtual de bacterias*: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \log_{10}$ (99,99%) respecto del

\log_{10} de $n_{t=0}$.

**Integración farmacocinética/
farmacodinámica (FC-FD)**

Se determinó la relación entre los valores de las concentraciones de ciprofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) y los respectivos valores de E observados al final del ensayo (5 h).

RESULTADOS

Los valores de CIM de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 en CMH y CMH-SB fueron de 0,0188 y 0,0047 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que el valor de la CPM en CMH fue de 0,60 $\mu\text{g/ml}$. Las curvas de muerte construidas en CMH, CMH-SB y CMH-AD se hallan representadas en el Gráfico 1.

En CMH solamente se obtuvo un efecto bactericida ($E \geq 3$) con concentraciones de 0,300 $\mu\text{g/ml}$ (16 x CIM) y 0,600 $\mu\text{g/ml}$ (32 x CIM) entre las 2 y 3 horas de iniciado el ensayo, pero al final del mismo (5 h), ninguna concentración de ciprofloxacina logró un efecto bactericida, presentando valores de E entre -2,005 (99,01%) y -2,882 (99,87%). También se observó que luego de dos horas de exposición al antibiótico

entre concentraciones de 0,0750 $\mu\text{g/ml}$ (4 x CIM) y 0,60 $\mu\text{g/ml}$ (32 x CIM), el conteo de bacterias viables tendió a mantenerse constante en el tiempo.

Por otra parte, en CMH-SB el número de bacterias viables se redujo en forma directa al incremento de los niveles de ciprofloxacina y se obtuvieron valores de $E > -3$ con concentraciones de 0,0188 $\mu\text{g/ml}$ (4 x CIM) y 0,150 $\mu\text{g/ml}$ (32 x CIM), mientras que valores de $E > -4$ se obtuvieron con concentraciones de 0,0375 $\mu\text{g/ml}$ (8 x CIM) y 0,0750 $\mu\text{g/ml}$ (16 x CIM).

En CMH-AD se observó que ninguna concentración de ciprofloxacina logró valores de $E > -3 \log_{10}$ respecto del \log_{10} de $n_{t=0}$ (1×10^9 UFC/ml). La relación entre las concentraciones de ciprofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) y la diferencia entre los valores del \log_{10} del conteo de bacterias viables (UFC/ml) al final y al comienzo de las curvas de muerte bacteriana (E) en CMH, CMH-SB y CMH-AD se presentan en el Gráfico 2.

La eficacia expresada como porcentaje de bacterias eliminadas respecto del conteo inicial en función de diferentes concentraciones de ciprofloxacina se presenta en la Tabla 1.

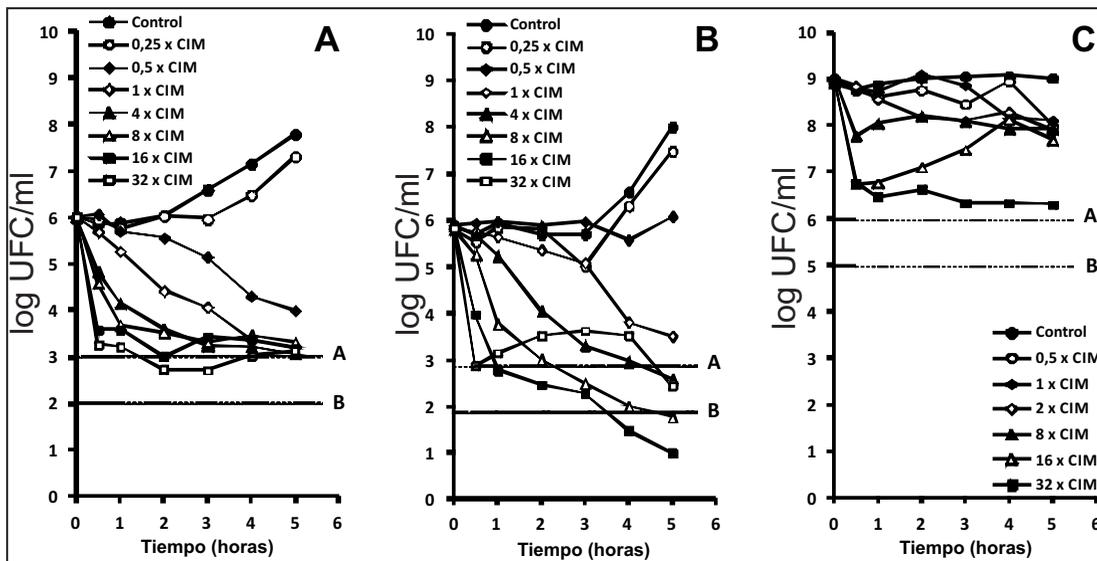


Gráfico 1. Curvas de muerte bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 enfrentada a ciprofloxacina en (A) caldo Mueller Hinton; (B) caldo Mueller Hinton y suero bovino en proporción 50:50 y (C) caldo Mueller Hinton con alta densidad bacteriana. Las líneas de puntos horizontales representan los puntos de corte teóricos para evaluar la eficacia del antibiótico; (A) reducción de $3 \log_{10}$ del conteo de bacterias inicial, (B) reducción de $4 \log_{10}$ del conteo de bacterias inicial.

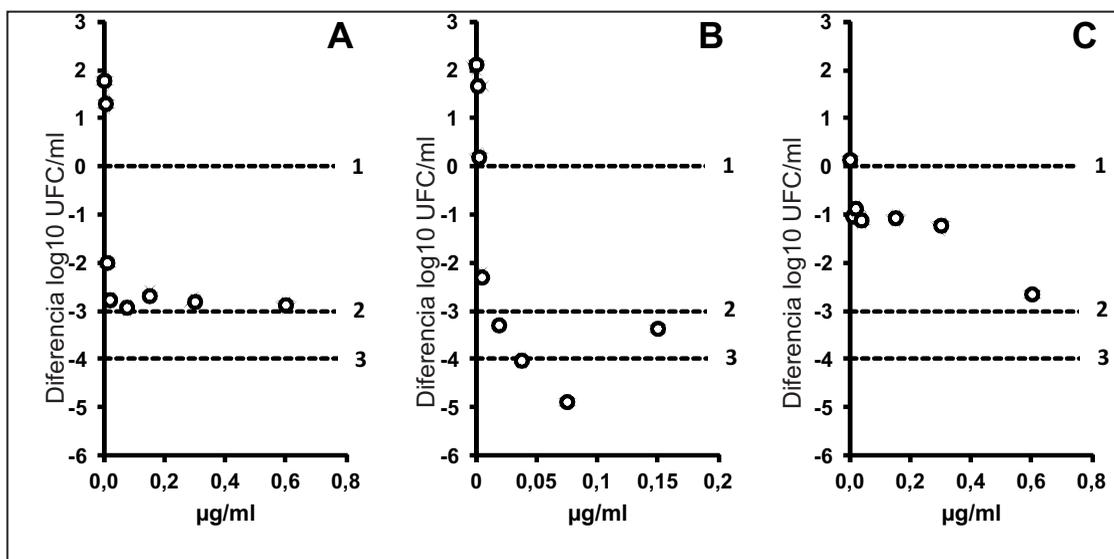


Gráfico 2. Relación entre concentraciones de ciprofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) y la diferencia entre los valores del \log_{10} del conteo de bacterias viables (UFC/ml) de *Escherichia coli* ATCC 25922 al final y al comienzo de las curvas de muerte ($0,5 \times 10^6$ UFC/ml) construidas en (A) caldo Mueller Hinton; (B) caldo Mueller Hinton y suero bovino en proporción 50:50 y (C) caldo Mueller Hinton con alta densidad bacteriana (1×10^9 UFC/ml). Las líneas de puntos horizontales representan los puntos de corte teóricos para evaluar la eficacia del antibiótico: (1) efecto bacteriostático, (2) efecto bactericida con eliminación del 99,9% de bacterias iniciales y (3) erradicación bacteriana con eliminación del 99,99% de bacterias iniciales.

Tabla 1. Relación entre concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) y eficacia de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Mueller Hinton (CMH) y caldo Mueller Hinton y suero bovino en proporción 50:50 (CMH-SB) en curvas de muerte realizadas con un inóculo de concentración bacteriana estándar ($0,5 \times 10^6$ UFC/ml). La eficacia se expresa como porcentaje de reducción del número de bacterias viables al final del ensayo (5 h) respecto del conteo de bacterias viables inicial.

CR ^a	CMH		CMH-SB	
	$\mu\text{g/ml}$	Eficacia (%)	$\mu\text{g/ml}$	Eficacia (%)
0,25 x CIM	0,0047	-	0,0012	-
0,5 x CIM	0,0094	99,01	0,0023	-
1 x CIM	0,0188	99,83	0,0047	99,51
4 x CIM	0,0750	99,88	0,0188	99,95
8 x CIM	0,1500	99,80	0,0375	99,99
16 x CIM	0,3000	99,85	0,0750	100,00
32 x CIM	0,6000	99,87	0,1500	99,96

^a CR: concentración relativa a la CIM.

DISCUSIÓN

La posología de los antibióticos tradicionalmente se ha establecido a partir de diseños experimentales evaluando la remisión clínica de la enfermedad en función del porcentaje de supervivencia de una población tratada. Sin embargo, la remisión de un cuadro clínico

no siempre se corresponde con la erradicación bacteriana. Actualmente se asume que para garantizar el éxito de un tratamiento antibiótico se debe lograr la cura bacteriológica. Desde esta óptica, un esquema posológico óptimo para las FQs sería aquel que permita alcanzar rápidamente concentraciones por encima de la

CPM y que luego éstas disminuyan rápidamente a concentraciones menores a la CIM, donde la presión de selección de subpoblaciones de bacterias resistentes es menor¹⁹.

Los ensayos de curvas de muerte bacteriana tienen por finalidad evaluar la eficacia en función del tiempo de diferentes concentraciones fijas de un antibiótico, a fin de seleccionar aquellas que tienen la capacidad de reducir el conteo de bacterias a niveles compatibles con su virtual erradicación.

Tomando en consideración los puntos de corte de eficacia antibacteriana propuestos por Sidhu *et al.* (2011)¹⁶, la actividad de las diferentes concentraciones de un antibiótico se pueden valorar considerando dos bandas en las cuales se situaría el recuento de bacterias al final del ensayo. La primera banda se corresponde con la reducción del número de bacterias entre $-3 \log_{10}$ (99,9%) y $-4 \log_{10}$ (99,99%) respecto del \log_{10} de $n_{t=0}$ (efecto bactericida) y que podría ser compatible con la cura clínica.

La segunda banda se corresponde con la erradicación virtual de bacterias logrando una reducción $\geq -4 \log_{10}$ (> 99,99%) del \log_{10} de $n_{t=0}$, pudiendo esta banda llegar a ser compatible con la cura bacteriológica.

La corta duración de este estudio (5 h) se fundamenta en el hecho que las FQs presentan actividad dependiente de la concentración, y la actividad bactericida de éstas expresada como velocidad de reducción del número de bacterias viables en función del tiempo es mayor al inicio de los ensayos (3-5 h) que al final de los mismos (>12 h)^{11,14}, al tiempo que se observó que en ensayos de larga duración, muchas bacterias podían reiniciar su crecimiento luego de un período de latencia^{9,15,14}.

La incorporación de SB a los ensayos de determinación de CIM de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, redujo el valor de la CIM de 0,0188 $\mu\text{g/ml}$ a 0,0047 $\mu\text{g/ml}$. El incremento de la potencia de ciprofloxacina se manifestó en forma notoria en los resultados obtenidos en las curvas de muerte, donde en CMH-SB, se logró situar el recuento de bacterias en las bandas de actividad bactericida (4 x CIM

y 32 x CIM) y de erradicación bacteriana (8 x CIM y 16 x CIM) (Gráfica 2B), utilizando concentraciones con valores 50% menores a las respectivas utilizadas en las curvas construidas en CMH (Tabla 1).

La utilización de un inóculo bacteriano de alta densidad en la construcción de una curva de muerte puede cuestionarse por el hecho de que son pocos los procesos infecciosos en donde se alcanza esta concentración bacteriana. Sin embargo, la presencia de procesos infecciosos crónicos que afectan a territorios compartimentalizados en los que el tamaño del inóculo puede ser elevado, lo justifica. Asimismo, la realización de este ensayo en ausencia de SB simula la situación particular de estos procesos localizados en los que la respuesta inmune no es suficiente para eliminar el agente causal. En este contexto, los hallazgos más sobresalientes en este estudio fueron que en la curva de muerte realizada en CMH con una densidad bacteriana estándar ($0,5 \times 10^6$ UFC/ml), concentraciones elevadas de ciprofloxacina (16 x CIM y 32 x CIM) no fueron suficientes para situar el conteo de bacterias en la banda de efecto bactericida al finalizar el ensayo (Gráfico 2A).

La falta de actividad de elevadas concentraciones puede ser explicada por el fenómeno de tolerancia fenotípica. En este caso, ciprofloxacina es un antibiótico cuya actividad es mayor sobre bacterianas en fase de crecimiento logarítmico²² y una exposición más o menos prolongada, favorecería la proliferación de bacterias de crecimiento lento^{18,21}, reduciendo la actividad de ciprofloxacina y dando lugar a que el conteo de bacterias permanezca más o menos constante hasta la finalización del ensayo. Por otra parte, en la curva de muerte construida en CMH en presencia de una elevada densidad bacteriana (1×10^9 UFC/ml), ninguna concentración logró una reducción del 99,9% del conteo bacteriano inicial (Gráfico 2C), considerando que la máxima concentración de ciprofloxacina utilizada (32 x CIM) correspondió al valor estimado de la CPM (0,60 $\mu\text{g/ml}$). Este resultado podría ser explicado por una concentración relativamente insuficiente de ciprofloxacina en

relación al número de bacterias.

Estos resultados dan lugar a una reconsideración del criterio con el que se deberían establecer los puntos de corte para evaluar la eficacia de las concentraciones de los antimicrobianos en función de la concentración de bacterias.

Si consideramos los ensayos de curva de muerte en donde se utilizó un inóculo estándar ($0,5 \times 10^6$ UFC/ml) donde 5,7 fue el valor del \log_{10} de $n_{t=0}$, entonces una reducción de ese valor en 3 puntos (de 5,7 a 2,7) y 4 puntos (de 5,7 a 1,7) equivalen a reducir el conteo de bacterias a valores de 500 UFC/ml (reducción del 99,9% - efecto bactericida) y 50 UFC/ml (reducción del 99,99% - efecto de erradicación) respectivamente.

Si por el contrario, consideramos los ensayos en donde se utilizó un inóculo de alta densidad bacteriana (1×10^9 UFC/ml), donde 9 fue el valor del \log_{10} de $n_{t=0}$, entonces para reducir el conteo de bacterias a 500 UFC/ml (efecto bactericida) sería necesario establecer como punto de corte la reducción de este valor en 6,3 puntos (de 9,0 a 2,7) y para reducir el conteo bacteriano a 50 UFC/ml (erradicación bacteriana) sería necesario reducir el valor del \log_{10} de $n_{t=0}$ en 7,3 puntos (de 9,0 a 1,7).

CONCLUSIÓN

Los resultados de actividad *in vitro* de diferentes concentraciones de antibióticos generada en los modelos estandarizados de curvas muerte bacteriana, son una base sólida para proponer dosis que garanticen la eficacia de éstos. No obstante, los resultados obtenidos a partir de un ensayo *in vitro* de curva de muerte que incorpora la actividad de factores de respuesta inmune presentes en el SB, muestran que en presencia de éstos la actividad de las concentraciones de ciprofloxacina es mayor que la observada en una curva de muerte estándar.

En este contexto, las concentraciones que demostraron ser eficaces sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 en presencia de SB, podrían ser son mucho más elevadas que las que se necesitarían en un escenario *in vivo*, debido a

que en este caso, la actividad del antibiótico sería influenciada no solo por los factores de respuesta inmune presentes en el SB, sino por la totalidad de la respuesta inmune del individuo. No obstante, la sobredimensión de las concentraciones efectivas obtenidas en curvas de muerte estándar, operaría como un factor de seguridad ante la variabilidad de la magnitud de la respuesta inmune de los individuos tratados.

Por otra parte los resultados obtenidos en este estudio permiten inferir que el empleo sistémico de los antibióticos en focos infecciosos crónicos y localizados, no es suficiente para producir la cura bacteriológica y nada reemplaza al tratamiento quirúrgico de los mismos como extirpación y drenajes entre otros. Finalmente podemos decir que la dosis efectiva óptima está condicionada por diversos factores tales como la carga bacteriana y el nivel de respuesta inmune del individuo tratado.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio pudo realizarse gracias al soporte económico proporcionado por la Universidad Nacional del Litoral, Argentina, en el marco de la convocatoria de proyectos CAI+D 2011.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blondeau, J. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet Dermatol.* 2009; 20:383-96.
2. Browne, A.; Vearncombe, M.; Sibbald, R. High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neutrophobic ulcers retards wounds healing after application of Dermagraft. *Ostomy Wound Manag.* 2001; 47:44-9.
3. Cengiz, M.; Arslan, E.; Sorucu, A. *In vitro* pharmacodynamics of enrofloxacin against on *Escherichia coli* gyrA mutant. *J of Anim and Vet Adv.* 2011; 10(18):2384-88.
4. Chalkley, L.; Koornhof, H. Antimicrobial activity of ciprofloxacina against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia*

- coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob Agents Ch.* 1985; 28(2):33-42.
5. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; Approved guideline. 3rd Edition 2008, Document M37-A3. Volume 28, Number 7. Wayne, Pennsylvania USA.
 6. Debnath, N.; Sil, B.; Selim, S.; Prodhan, M.; Howlader, M. A retrospective study of calf morbidity and mortality in small holder traditional farms in Bangladesh. *Prev Vet Med.* 1990; 9(1):1-7.
 7. Drusano, G.; Johnson, D.; Rosen, M.; Standiford, H. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of pseudomonas sepsis. *Antimicrob Agents Ch.* 1993; 37(3):483-90.
 8. García Rodríguez, J.; Cantón, R.; García Sánchez, J.; Gómez-Lus, M.; Martínez Martínez, L.; Rodríguez-Avial, C.; Vila, J. Métodos Especiales para el Estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. En Juan J. Picazo Editor: Procedimientos en Microbiología Clínica; SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Primera Edición. España. 2001; 1-38.
 9. Haritova, A.; Rusenova, N.; Parvanov, P.; Lashev, L., Fink-Gremmels, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of danofloxacin in turkeys. *Vet Res Commun.* 2006; 30:775-89.
 10. Hooper, D. Clinical application of quinolones. *Antimicrob Agents Ch.* 1998; 41:1190-92.
 11. Hyatt, J.; Nix, D.; Schentag, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob Agents Ch.* 1994; 38: 2730-37.
 12. Katie, L.; Davies, R., Threlfall, E. Mechanims of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25:358-73.
 13. Matson, K.; Ricklefs, R.; Klasing, K. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev Comp Immunol.* 2005; 28:34-49.
 14. Mouton, J.; Vinks, A. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic modeling of antibacterials *in vitro* and *in vivo* using bacterial growth and kill kinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44: 201-10.
 15. Schneider, M.; Valle, M.; Woehrlé, F.; Boisrame, B. Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J Dairy Sci.* 2004; 87:202-11.
 16. Sidhu, P.; Landoni, M.; Aliabadi, F.; Lees, P. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *ResVet Sci.* 2011; 88:134-41.
 17. Tosi, M. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116:241-49.
 18. Tuomanen, E.; Cozens, R.; Tosch, W.; Zak, O.; Tomasz, A. The rate of killing of *E. coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *Microbiol.* 1986; 132(5):1297-304.
 19. Vallé, M.; Schneider, M.; Galland, D.; Giboin, H.; Woehrlé, F. Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Therap.* 2012; 35(6):519-18.
 20. White, R. What *in vitro* models of infection can and cannot do?: potential drawbacks of *in vitro* pharmacodynamic studies. *Pharmacotherapy.* 2001; 21(11S).
 21. Wiuff, C.; Zappala, R.; Regoes, R.; Garner, K.; Baquero, F.; Levin, B. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Ch.* 2005; 49(4):1483-94.
 22. Zeiler, H. Evaluation of the *in vitro* bactericidal action of ciprofloxacin on cells of *Escherichia coli* in the logarithmic and stationary phases of growth. *Antimicrob Agents Ch.* 1985; 28(4):524-27.