



LARISSA ALEXSANDRA FELIX

**INTEGRAÇÃO PK/PD NA MEDICINA VETERINÁRIA:
DETERMINAÇÃO DE DOSES INTRAMUSCULAR DE
CLOXACILINA SÓDICA PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR
Staphylococcus spp EM CAPRINOS**

LAVRAS – MG

2023

LARISSA ALEXSANDRA FELIX

**INTEGRAÇÃO PK/PD NA MEDICINA VETERINÁRIA: DETERMINAÇÃO DE
DOSES INTRAMUSCULAR DE CLOXACILINA SÓDICA PARA INFECÇÕES
CAUSADAS POR *Staphylococcus* spp EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Marcos Ferrante
Orientador

Dr. Humberto de Mello Brandão
Dra. Patrícia Yoshida Faccioli Martins
Coorientadores

LAVRAS – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Felix, Larissa Alexsandra.

Integração PK/PD na Medicina Veterinária: Determinação de doses intramuscular de cloxacilina sódica para infecções causadas por *Staphylococcus* spp em caprinos / Larissa Alexsandra Felix. - 2023.

58 p. : il.

Orientador(a): Marcos Ferrante.

Coorientador(a): Humberto de Mello Brandão, Patrícia Yoshida Faccioli Martins.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Antibioticoterapia. 2. Integração farmacocinética/farmacodinâmica. 3. Farmacometria. I. Ferrante, Marcos. II. Brandão, Humberto de Mello. III. Martins, Patrícia

LARISSA ALEXSANDRA FELIX

Integração PK/PD na Medicina Veterinária: Determinação de doses intramuscular de cloxacilina sódica para infecções causadas por *Staphylococcus* spp em caprinos

PK/PD integration in Veterinary Medicine: Determination of intramuscular doses of sodium cloxacillin intramuscular for infections caused by *Staphylococcus* spp in goats

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de Dezembro de 2022

Dr. Gonzalo Suárez Veneirano – Universidad de la República
Dr. Humberto de Mello Brandão – Embrapa Gado de Leite
Dr. Gláucia Frasnelli Mian – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Marcos Ferrante
Orientador

Dr. Humberto de Mello Brandão
Dra. Patrícia Yoshida Faccioli Martins
Coorientadores

LAVRAS – MG

2023

AGRADECIMENTOS

À Deus por me acompanhar em mais uma etapa da minha vida, me dar sabedoria, paciência e domínio próprio.

Aos meus pais, Taime e Marcelo, pelo amor incondicional, apoio emocional, suporte financeiro e todo incentivo dia a dia. Por entenderem esse momento em que foi muito corrido, intenso e que nem sempre pude estar presente.

Ao Marcos Ferrante, meu orientador, que acreditou em mim mesmo quando nem eu enxergava esse potencial em mim, me estendeu a mão e me apresentou o mundo da farmacometria, me dando liberdade e apoio durante as etapas de aprendizagem.

Aos alunos do NEFARM e da iniciação científica, principalmente meus companheiros Lucas Wamser, Bruna Soares e Lidiane Bastos, que me ensinaram a cada dia sobre farmacometria, liderança, trabalho em grupo e que com toda a certeza tornaram o mestrado mais leve e alegre. Bru e Lucas, espero vocês ano que vem no mestrado!!

A minha amiga/irmã Érika, que me acompanha desde a residência e que esteve passando por todas as emoções do mestrado ao meu lado. E a Camila Lebani, que mesmo longe pode estar me acompanhando e me iluminando com suas palavras de sabedoria.

Ao Chico (Francisco Duque) e a Deborah Resende por serem minha base aqui em Lavras e continuarem cuidando, ensinando e me ouvindo (e muito, hahahahha) mesmo após a residência.

Ao Henrique, meu namorado, por todo apoio, incentivo, confiança e muita paciência, que esteve comigo mesmo nos momentos de maior estresse.

Aos meus coorientadores que me ensinaram mais sobre pesquisa, trabalho em equipe e interdisciplinaridade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFLA e à Universidade Federal de Lavras.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 448011/2014-0), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-01168-21) e da EMBRAPA (SEG 20.20.03.002.00.00).

RESUMO

A modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) é uma ferramenta utilizada no processo de desenvolvimento de fármacos para a seleção de regimes de dosagens para uso em ensaios clínicos. Esta abordagem é um processo interativo que reúne experimentos *in vitro* e *in vivo*, modelos PK populacionais e simulações *in silico* para determinar/otimizar regimes de dosagem. Com a emergência da resistência antimicrobiana (AMR), esta ferramenta passou a ser utilizada também para otimização de regimes de doses dos medicamentos disponíveis no mercado. No Brasil essa estratégia de ajuste de regimes de dosagem para fármacos disponíveis no mercado ainda não foi adotada na Medicina Veterinária. Assim, este trabalho tem como objetivos elucidar aspectos da modelagem PK/PD na seleção e otimização de regimes de dosagens para antimicrobianos na medicina veterinária e apresentar nosso estudo, o qual utilizou a integração PK/PD para definição de protocolos terapêuticos de cloxacilina sódica para o tratamento sistêmico de infecções por *Staphylococcus* spp. em caprinos. Este grupo de pesquisa é o primeiro a trabalhar com farmacometria na medicina veterinária no Brasil, sendo este, um dos primeiros trabalhos com essa metodologia na veterinária no país.

Palavras-chave: Antibioticoterapia. Integração farmacocinética/farmacodinâmica. Farmacometria. Penicilinas. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modeling is used in the drug development process to select dosage regimens for use in clinical trials. This approach is an interactive process that brings together *in vitro* and *in vivo* experiments, population PK models, and *in silico* simulations to determine/optimize dosing regimens. With the emergence of antimicrobial resistance (AMR), this tool has also been used to optimize dose regimens for drugs available on the market. In Brazil, this strategy of adjusting dosage regimens for drugs available on the market has not yet been adopted in veterinary medicine. Thus, this study aims to elucidate aspects of PK/PD modeling in the selection and optimization of dosage regimens for antimicrobial in Veterinary Medicine and to present our study, which used PK/PD integration to define therapeutic protocols of cloxacillin sodium for systemic treatment of infections by *Staphylococcus* spp. in goats. This research group is the first to work with pharmacometrics in veterinary medicine in Brazil, and this is one of the first works in veterinary with this methodology in the country.

Keywords: Antibiotic therapy. Integration pharmacokinetic/pharmacodynamic. Penicillin. Pharmacometry. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo Farmacocinético de dois compartimentos.	15
Figura 2- Estrutura do Modelo Farmacocinética Populacional (popPK).	16
Figura 3- Relação entre os modelos farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD).	17
Figura 4- Esquema de Medicina Translacional e Medicina Translacional Reversa.....	18
Figura 5- Fatores relacionados a eficácia antimicrobiana: microrganismo, hospedeiro e antimicrobiano.	20
Figura 6 - Representação dos índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) associados a eficácia dos antimicrobianos <i>in vivo</i>	21
Figura 7- Representação da relação de colistina e <i>P. aeruginosa</i> para cada um dos índices PK/PD	22
Figura 8 - Gráfico de exemplo de ASC _{24h} /CIM versus alteração na contagem bacteriana desde a contagem inicial (log ₁₀ CFU/mL).....	23
Figura 9- Representação gráfica da Probabilidade de Atingir o Alvo (PTA)	25

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Fração não ligada (%) de benzilpenicilina e cloxacilina à proteína sérica em diferentes espécies	31
Tabela 1- Estudos de farmacocinética de cloxacilina na medicina veterinária	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AMR - Resistência antimicrobiana, do termo inglês *Antimicrobial resistance*

AAS - Antibióticos Antiestafilocócicos

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – Área sob a curva

ASC₂₄ – Área sob a curva de 24 horas

ASC/CIM – Área sob a curva concentração-tempo dividida pela concentração inibitória mínima

BrCAST -Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CIM – Concentração inibitória mínima

CIM₅₀ - Concentração inibitória mínima em que 50% da população de isolados são inibidos

CIM₉₀ - Concentração inibitória mínima em que 90% da população de isolados são inibidos

Cl – Eliminação/depuração, do termo em inglês *Clearance*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLOX – Cloxacilina

C_{max} – Concentração máxima

C_{max}/CIM – Concentração máxima dividida pela concentração inibitória mínima

CoPS - Staphylococcus coagulase positivo

CoNS - Staphylococcus coagulase negativo

ECOFF – *Cut-off* (ponto de corte) epidemiológico

EMA – *European Medicines Agency*

E_{max} - efeito máximo (inibição máxima do crescimento bacteriano)

E-R – Relação exposição-resposta, do termo em inglês *exposure-response relationships*

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

f- Fração do fármaco livre de proteína plasmática

FDA - *Food and Drug Administration*

Ka – Constante de absorção

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRSA – Staphylococcus aureus resistente à meticilina, do termo em inglês *Meticillin Resistente Staphylococcus aureus*.

MRSP - *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina, do termo em inglês *Meticillin Resistente Staphylococcus pseudintermedius*.

MSSA - *Staphylococcus* meticilina-sensível do termo em inglês *Meticillin Suscetible Staphylococcus aureus*.

NLMEM - *nonlinear mixed-effects* - modelo não linear de efeitos mistos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBPK - farmacocinética baseada na fisiologia

PD – Farmacodinâmica, do termo em inglês *Pharmacodynamic*

PDT - Alvo farmacodinâmico/farmacocinético, do termo em inglês *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Target*

PK – Farmacocinética, do termo em inglês *Pharmacokinetic*

PK/PD - farmacocinética/farmacodinâmica

popPK – Farmacocinética populacional

PTA – *Probability of target attainment* – Probabilidade de atingir o alvo

R^2 - *coeficiente de regressão*

$T > CIM$ – Tempo maior que a concentração inibitória mínima

UFC – Unidade formadora de colônias

V_d – Volume de distribuição

$\%T > CIM$ – Porcentagem do tempo que a concentração do fármaco ficou maior que a concentração inibitória mínima

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD)	13
2.1.1 Alguns conceitos iniciais.....	13
2.1.2 O que são modelos?.....	14
2.1.3 Modelo Farmacocinético (PK)	14
2.1.4 Modelos farmacocinéticos populacionais (popPK).....	15
2.1.5 Modelo farmacodinâmico (PD).....	16
2.1.6. Modelos farmacocinético/farmacodinâmicos (PK/PD)	17
2.2. Modelos Translacional e Translacional Reverso	18
2.3. Índices farmacocinéticos farmacodinâmicos (PK/PD)	19
2.4. Integração farmacocinética/farmacodinâmica para otimização do regime de doses de antimicrobianos	25
2.5. <i>Staphylococcus</i> spp.	26
2.5.1. Aspectos Gerais.....	26
2.5.2. Espécies de <i>Staphylococcus</i> de importância na Medicina Veterinária	27
2.5.3. Importância de <i>Staphylococcus</i> spp. na caprinocultura	28
2.5.4. <i>Staphylococcus</i> meticilina-sensível (MSSA)	29
2.6. Cloxacilina	30
REFERÊNCIAS	33
SEGUNDA PARTE	43
ARTIGO - INTEGRAÇÃO PK/PD PARA DETERMINAÇÃO DE DOSE INTRAMUSCULAR DE CLOXACILINA SÓDICA PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Staphylococcus</i> spp EM CAPRINOS	43

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos (AMR, do termo em inglês *antimicrobial resistance*) é um problema grave e global, sendo declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos 10 problemas que ameaçam a saúde única mundial (RODRÍGUEZ-GASCÓN; SOLINÍS; ISLA, 2021). Em um estudo realizado por Murray et al. (2022) foi estimada aproximadamente 5 milhões de mortes/ano associadas à AMR, durante o ano de 2019 em 204 países e territórios, sendo 1,27 milhões associadas a infecção bacteriana. A OMS estima que em 2050 as mortes aumentarão para 10 milhões de pessoas ao ano (MI et al., 2022).

Como resultado da AMR os medicamentos tornam-se ineficazes e as infecções persistem no corpo, aumentando a morbidade, a mortalidade e o risco de propagação das infecções. Ademais, há um significativo impacto econômico que compromete a capacidade de tratar as doenças infecciosas e impede os avanços no campo da medicina (ZHU; HUANG; YANG, 2022). A seleção de microrganismos resistentes aumenta com o uso desnecessário e indiscriminado de antimicrobianos, uso de antimicrobianos com amplo espectro, subdosagens e terapias com duração inadequada (GUARDABASSI et al., 2018). Assim, a definição de um tratamento antimicrobiano com precisão é crucial para aumentar a eficácia terapêutica e diminuir o risco de induzir AMR e afetar a microbiota do hospedeiro (RAWSON et al., 2021).

A otimização das terapias antimicrobianas, como proposto pela OMS em seu Plano de ação Global para enfrentar a resistência antimicrobiana (WHO, 2015), é realizada por meio de modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD), uma abordagem já utilizada no processo de desenvolvimento de fármacos, de forma a selecionar regimes de dosagem (dose, intervalo e frequência de administração) adequados e com potencial eficácia, para os estudos clínicos (JORDA; ZEITLINGER, 2020; TOUTAIN et al., 2021).

A Medicina Veterinária também tem sua contribuição com a disseminação da AMR, o que acarreta importantes custos à saúde e economia da população (INNES et al., 2020). Portanto, a otimização do uso de antimicrobianos também se aplica a Medicina Veterinária, assim, na Europa a *European Medicines Agency* (EMA) desenvolveu uma *guideline* (EMA, 2016a) para regularizar a produção de medicamentos veterinários, o qual também tem sido

utilizado como base para otimização de doses de medicamentos veterinários disponíveis no mercado (GUARDABASSI *et al.*, 2018).

Essa abordagem tem já tem sido realizada na Medicina Veterinária como uma estratégia de otimizar regimes de dosagem para fármacos presentes no mercado, como observado nos estudos de Less *et al.* (2015) para determinação de um regime de doses de amoxicilina contra *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* em bezerros, e de Dorey *et al.* (2017) com o florfenicol contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* em suínos. No Brasil, as agências regulatórias, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda não implantaram esta ferramenta. Entretanto, nossa equipe de pesquisa tem já trabalhado com a modelagem PK/PD, de forma a se estruturar como o primeiro grupo de Veterinários no Brasil a trabalharem com farmacometria.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica (PK/PD)

2.1.1 Alguns conceitos iniciais

A farmacocinética estuda a cinética do fármaco no organismo, está inclui processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação (ADME), de uma forma geral, representa o que o corpo faz com o fármaco. Por outro lado, a farmacodinâmica estuda o efeito farmacológico/toxicológico, ou seja, o que o fármaco faz com o corpo (FAN; DE LANNOY, 2014; ROBERTS; TACCONE; LIPMAN, 2016). Entender o comportamento do fármaco no organismo é fundamental para definição de regime de dosagem racional, seja para ser usado em estudos clínicos de eficácia e toxicidade ou para otimizar regimes utilizados na rotina (CAVALHEIRO; COMARELLA, 2016).

A farmacometria é definida pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) como “a ciência que quantifica informações sobre medicamentos, doenças e ensaios para auxiliar no desenvolvimento eficiente de medicamentos e/ou decisões regulatórias”(ZHU, 2021). A farmacometria utiliza modelos matemáticos de fisiologia, farmacologia e doenças para descrever e quantificar as interações entre medicamentos e

paciente. Ou seja, utiliza modelos farmacocinéticos (PK), farmacodinâmicos (PD), exposição-resposta (modelos PK/PD) e de progressão de doença (JANSSEN; BENNIS; MATHÔT, 2022).

Em virtude do avanço na tecnologia, da maior digitalização dos dados nos hospitais e clínicas, da qualidade dos dados coletados, dos testes laboratoriais realizados, da padronização dos procedimentos, entre outros, há disponibilidade de bancos de dados mais robustos. Em consequência, há uma maior atenção na oportunidade de aplicar a *macchine learning* e inteligência artificial como inovação na área da farmacometria, de forma a integrá-los com a modelagem e simulação (CHATURVEDULA *et al.*, 2019; MCCOMB; BIES; RAMANATHAN, 2022).

2.1.2 O que são modelos?

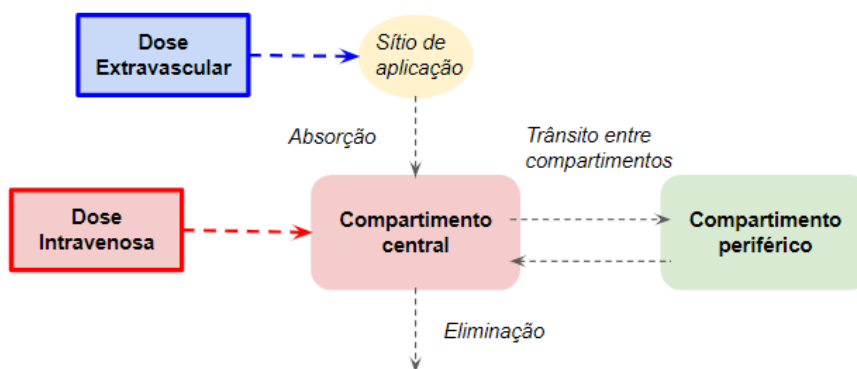
Os modelos matemáticos são representações de um sistema que utilizam ideias matemáticas e linguagem para produzir uma descrição aproximada do sistema real, a partir do modelo é possível fazer simulações de forma a prever o comportamento do sistema sob determinadas condições (HASAN *et al.*, 2022). No âmbito da farmacologia o sistema representado é o organismo animal. Assim, o modelo permite descrever e compreender o tempo de exposição a um fármaco e a resposta farmacológica após a administração de diferentes doses ou formulações de um medicamento (MOULD; UPTON, 2012). Modelos matemáticos tem sido utilizado no processo de desenvolvimento de novos fármacos e na predição de toxicidade induzida por fármacos (MODY *et al.*, 2020).

2.1.3 Modelo Farmacocinético (PK)

Os modelos farmacocinéticos descrevem a relação entre o fármaco administrado e sua concentração ao longo do tempo no organismo (MOULD; UPTON, 2012). O modelo PK tem como finalidade descrever os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação do fármaco. Neste, o organismo é representado como um sistema de um ou mais compartimentos, que não representam os compartimentos anatômicos e mecanismos fisiológicos (MI *et al.*, 2022). Os modelos podem ser monocompartimentais; bicompartimentais (FIGURA 1) inclui o compartimento central (tecidos mais vascularizados, como coração, rins e cérebro) e um compartimento periférico, ou multicompartimentais

(HANG *et al.*, 2016). Apenas os modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) descrevem o processo ADME com base nos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e fisicoquímicos, permitindo simular a concentração dos fármacos em diversos tecidos e fluidos, em diversos cenários biológicos (LIN *et al.*, 2016).

Figura 1- Modelo Farmacocinético de dois compartimentos.



Fonte: Adaptado de Rang e Dale (2016)

Os principais parâmetros farmacocinéticos são constante de absorção (K_a), volume de distribuição (V_d) e clearance (Cl), além disso, nos modelos multicompartmentais, existem parâmetros para expressar o trânsito entre os compartimentos (FAN; DE LANNOY, 2014).

2.1.4 Modelos farmacocinéticos populacionais (popPK)

Os modelos farmacocinéticos populacionais estudam a farmacocinética a nível da população, tendo como objetivo entender e avaliar o impacto das covariáveis (idade, sexo, raça, condição corporal, entre outra) na farmacocinética e consequentemente, na farmacodinâmica (FDA, 2022). A variabilidade farmacocinética é definida como fixa quando as causas de variabilidade são mensuráveis e previstas ou residual, quando as causas de variabilidade não podem ser identificadas definitivamente (RAWSON *et al.*, 2021). A variabilidade pode ser inter-individual, estando associada por exemplo a idade, raça, obesidade, medicações, comorbidades (doença renal, hepática, cardíaca), entre outros, ou intra-individual, associada a desbalanço hídrico, disfunção renal ou hepática, entre outros (MOULD; UPTON, 2013).

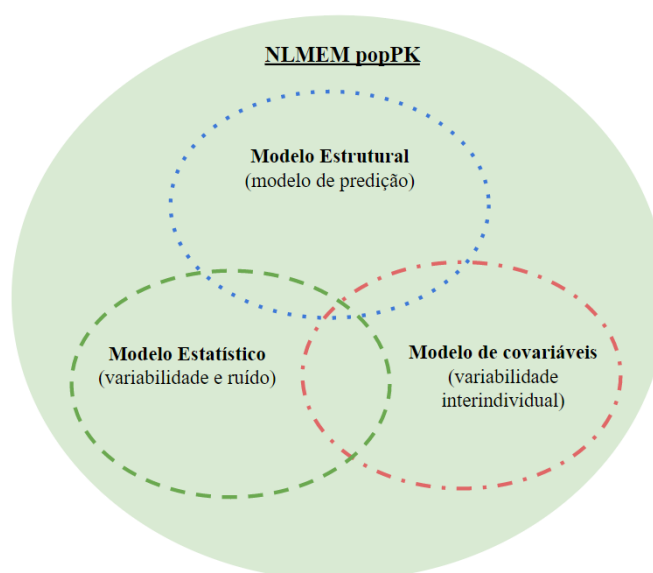
Os dados de todos os indivíduos em uma população são avaliados simultaneamente utilizando um modelo não linear de efeitos mistos (NLMEM), esta ferramenta permite

quantificar a variabilidade na disposição e resposta farmacológica de acordo com as características dos indivíduos na população (BON *et al.*, 2018).

“Não linear” refere-se ao fato de que a variável dependente (por exemplo, concentração) está relacionada de forma não linear com os parâmetros do modelo e a variáveis independentes. “Efeitos mistos” refere-se à parametrização: parâmetros que não variam entre indivíduos são referidos como “efeitos fixos”, parâmetros que variam entre os indivíduos são chamados de “efeitos aleatórios” (MOULD; UPTON, 2013).

Os modelos popPK são compostos pelos dados, modelo estrutural (descreve a concentração x tempo), o modelo estatístico (descrever a variabilidade residual), o modelo de covariáveis e o software responsável pelo modelamento (BON *et al.*, 2018; MOULD; UPTON, 2013). De forma geral, a estrutura do modelo pode ser representada pelo esquema abaixo (FIGURA 2).

Figura 2- Estrutura do Modelo Farmacocinética Populacional (popPK).



Legenda: NLEM. Modelo não linear de efeitos mistos; popPK. Modelo farmacocinético populacional.
Fonte: Adaptado de Bon *et al.* (2018)

2.1.5 Modelo farmacodinâmico (PD)

Os modelos farmacodinâmicos descrevem a relação da exposição ao fármaco com a resposta, ou seja, o efeito farmacológico/toxicológico, fornecendo informações mais robustas da ação do fármaco. Estes permitem estudar os aspectos fisiológicos e bioquímicos dos fármacos ou agentes patológicos no organismo (NIELSEN; FRIBERG, 2013). Os parâmetros

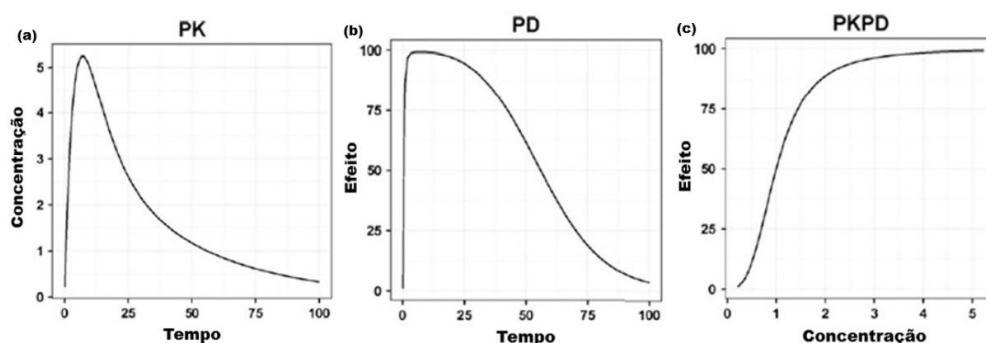
de modelos farmacodinâmicos representam a relação exposição-efeito, então estão associados ao tempo de início do efeito (Ex. imediato ou retardado), se a ação é de inibição ou estimulação e o comportamento da relação concentração-efeito (sigmoide, linear ou de efeito máximo) (UPTON; MOULD, 2014).

Assim como os modelos PK, os modelos PD também são analisados a nível populacional pela abordagem NLMEM, possuindo estrutura similar a representada na figura 2. A variabilidade na farmacodinâmica pode ser associada a resposta imune do hospedeiro, o tamanho do inóculo, o sítio de infecção, formação de biofilme, a concentração inibitória mínima do organismo (CIM), resistência antimicrobiana, penetração do fármaco, efeito pós-antibiótico, entre outros (RAWSON *et al.*, 2021).

2.1.6. Modelos farmacocinético/farmacodinâmicos (PK/PD)

Os modelos PK/PD permitem descrever a relação entre a concentração do fármaco e o efeito farmacológico, de forma a avaliar a variação no efeito farmacológico de acordo com a variação na concentração do fármaco (MOULD; UPTON, 2012). A modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) tem sido uma ferramenta muito utilizada na seleção e otimização de regimes de dosagem, principalmente para antimicrobianos (TOUTAIN *et al.*, 2021). Essa abordagem será discutida com mais detalhes no tópico 2.4. Uma representação gráfica dos perfis concentração-tempo (modelos PK), efeito-tempo (modelo PD) e concentração-efeito (modelo PK/PD) podem ser observados na figura 3.

Figura 3- Relação entre os modelos farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD).



Legenda: a. Modelo Farmacocinético (PK) - perfil concentração x tempo; b. Modelo farmacodinâmico (PD) – perfil efeito x tempo; c. Modelo farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD) – perfil de efeito por concentração.

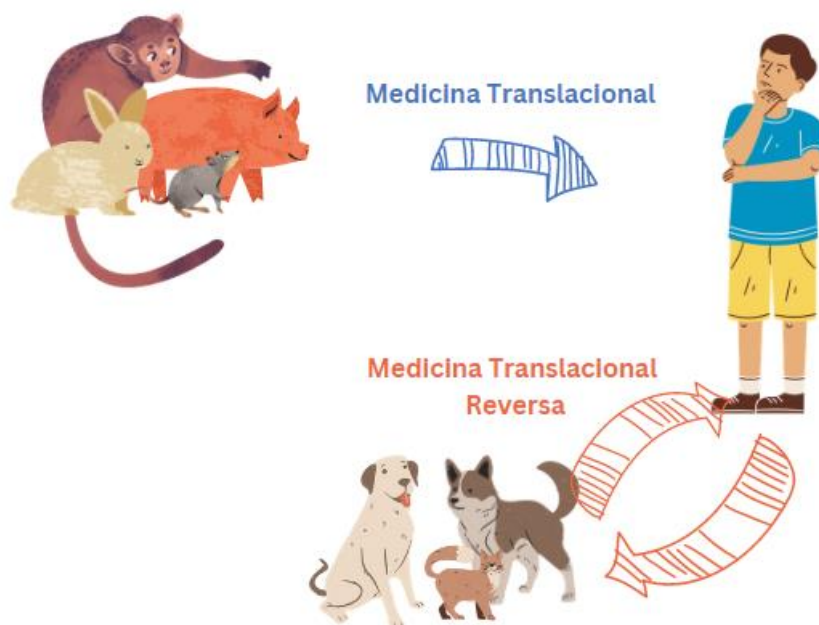
Fonte: Adaptado de Rawson *et al.* (2021)

2.2. Modelos Translacional e Translacional Reverso

Os modelos animais têm sido utilizados no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, são utilizados para caracterizar a fisiopatologia da doença, avaliar o mecanismo de ação dos fármacos e estabelecer as relações farmacocinéticas/farmacodinâmicas, de forma a estimar regimes de dosagem clínica e determinar margens de segurança e toxicidade (MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Os resultados obtidos nos estudos pré-clínicos em animais são então extrapolados para os seres humanos, sendo essa abordagem conhecida como translacional (BHAGUNDE *et al.*, 2019; SCHEETZ *et al.*, 2021).

Porém, como uma alternativa nas fases iniciais de pesquisa e desenvolvimento de fármacos, foi proposta a ciência translacional reversa, que tem como objetivo potencializar as informações disponíveis de humanos e animais que compartilham doenças análogas para desenvolver melhores previsões e terapias na medicina humana e veterinária (KASICHAYANULA; VENKATAKRISHNAN, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2018).

Figura 4- Esquema de Medicina Translacional e Medicina Translacional Reversa.



Fonte: Adaptado de Schneider et al. (2018)

2.3. Índices farmacocinéticos farmacodinâmicos (PK/PD)

Desde o momento que um medicamento é administrado no organismo, ele passa por processos farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção – ADME), que irão influenciar na concentração do fármaco no plasma e nos tecidos, e consequentemente, no seu efeito. Ao chegar no sítio de ação, na concentração adequada, o antibiótico irá realizar seu efeito (bactericida ou bacteriostático) no microrganismo (ASÍN-PRIETO; RODRÍGUEZ-GASCÓN; ISLA, 2015).

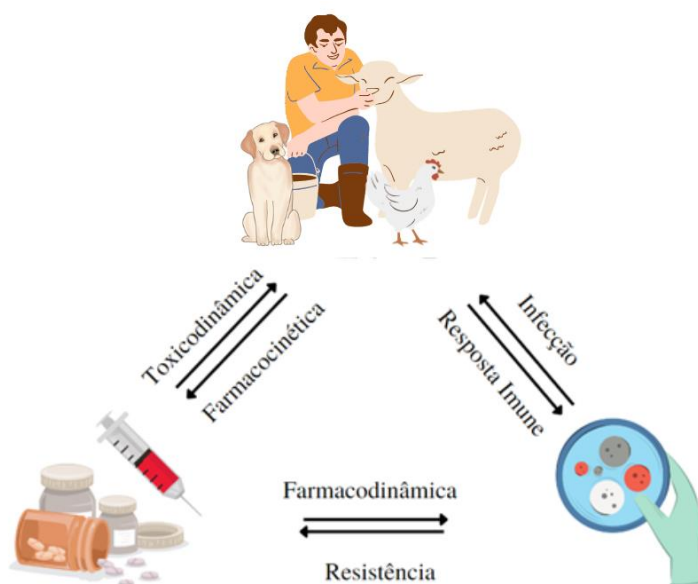
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é o maior indicador de efeito de um antimicrobiano, pois informa a susceptibilidade do patógeno a um determinado antibiótico (NIELSEN; CARS; FRIBERG, 2011). A CIM pode ser determinada pelas técnicas de microdiluição em placa, macrodiluição em tubo, ou o E-test, devendo ser seguido os padrões estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2018) ou pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – BrCAST (BRCAST, 2022).

A CIM utilizada é representativa de vários isolados de uma mesma espécie, assim, para cada bactéria é determinada a CIM, obtendo-se uma distribuição populacional. A metodologia utilizada para realização da CIM deve ser sempre descrita (EMA, 2016b). A partir da distribuição de CIMs podem ser calculados a CIM₅₀ e CIM₉₀ que representam os valores de CIM em que 50% e 90% da população de isolados são inibidos, respectivamente. Porém, as CIM₅₀ e CIM₉₀ não são capazes de diferenciar cepas *wild type* (cepas selvagens) das cepas com mecanismo de resistência adquirida (TURNIDGE; KAHLMEYER; KRONVALL, 2006). As cepas *wild type* são definidas pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) como aquelas espécies que não apresentam mecanismo de resistência adquirido fenotipicamente detectável ao agente antimicrobiano em questão (EUCAST, 2016).

Assim, uma alternativa é calcular o ponto de corte epidemiológico (ECOFF), que permite fazer essa diferenciação, assim, o valor de CIM abrangeria apenas as cepas *wild type*. O CLSI disponibiliza o software ECOFFinder (ECOFFinder program version XL 2010 v2.1, <https://clsi.org/meetings/microbiology/ecoffinder/>), um programa baseado na metodologia descrita por Turnidge *et al.* (2006), que permite analisar a distribuição populacional das CIMs e estimar uma população *wild type* e o ponto de corte epidemiológico. Estudos utilizando essa metodologia já foram realizados na Medicina Veterinária para otimização de dose de florfenicol contra *Piscirickettsia salmonis* em salmão (MARTÍN *et al.*, 2019) e oxitetraciclina frente *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* isolados de bezerros (LEES *et al.*, 2018).

Sabe-se que apenas a Concentração Inibitória Mínima não é capaz de refletir a interação entre patógeno, hospedeiro e antimicrobiano, fatores que também condicionam a resposta clínica. Entretanto, a análise da relação PK/PD dos antimicrobianos permite integrar as propriedades PK e PD de forma a otimizar a terapia antimicrobiana (FIGURA 5) (LANDERSDORFER; NATION, 2021; RODRÍGUEZ-GASCÓN; SOLINÍS; ISLA, 2021).

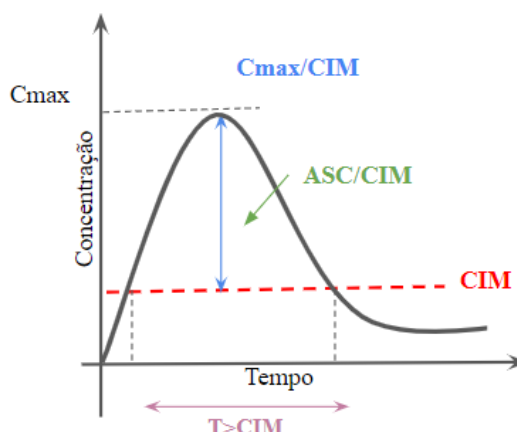
Figura 5- Fatores relacionados a eficácia antimicrobiana: microrganismo, hospedeiro e antimicrobiano.



Fonte: Adaptado de Asín-Prieto *et al.* (2015)

As relações de exposição do antimicrobiano ao microrganismo são estudadas a partir de modelos PK/PD, esses modelos podem ser *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, sendo considerados metodologias complementares (LUO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-GASCÓN; SOLINÍS; ISLA, 2021). A agência regulatória EMA tem estabelecido *guidelines* para garantir a qualidade dos medicamentos antimicrobianos (EMA, 2016a, 2016b, 2022). As relações PK/PD dos antimicrobianos podem ser classificadas em três índices PK/PD, que predizem a eficácia clínica, quais foram padronizados por Mouton *et al.* (2005) como: tempo em que a concentração do fármaco esteve acima da CIM ($T > CIM$), concentração máxima dividida pela CIM (C_{max}/CIM) e área sob a curva concentração-tempo dividida pela CIM (ASC/CIM) (NIELSEN; FRIBERG, 2013). A relação PK/PD dos antimicrobianos está esquematizados na figura 6.

Figura 6 - Representação dos índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) associados a eficácia dos antimicrobianos *in vivo*.



Legenda: CIM. Concentração Inibitória Mínima; ASC. Área sob a curva; $C_{máx}$. Concentração máxima do fármaco no plasma; $T > CIM$. Tempo em que a concentração do fármaco esteve acima da CIM; ASC/CIM . Área sob a curva concentração-tempo ao longo de 24 horas dividida pela CIM; $C_{máx}/CIM$. Concentração máxima dividida pela CIM. Se um subscrito indicando outro período de tempo não for presente, assume-se que a ASC é a de 24 h.

Fonte: Adaptado de Asín-Prieto *et al.* (2015) e Papich (2014)

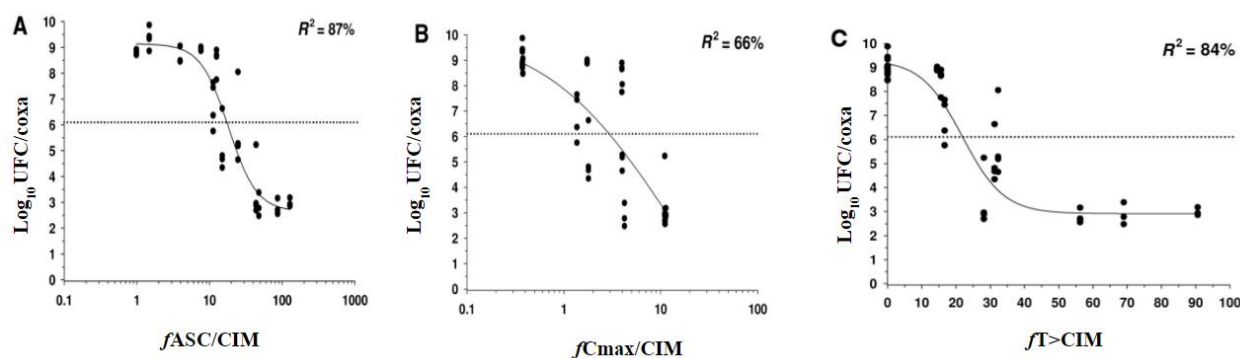
Os parâmetros farmacocinéticos acima são calculados a partir da concentração plasmática/sérica dos antimicrobianos ao longo do tempo. Quanto a essa concentração, o ideal é que seja considerada a fração não ligada a proteínas plasmáticas, ou seja, a fração livre (f), pois esta que irá realizar a ação farmacológica. A concentração do fármaco livre no plasma teoricamente está em equilíbrio com a concentração livre no fluido tecidual. Portanto, índices PK/PD que não consideram a fração livre pode superestimar a exposição do microrganismo ao antimicrobiano. Por isso, muitas vezes esses índices são representados da seguinte forma: $fT > CIM$, fC_{max}/CIM ou $fASC/CIM$ (PAPICH, 2014).

Para determinar o índice PK/PD mais apropriado e o alvo (*target*) farmacocinético/farmacodinâmico (PDT) é necessário realizar um ensaio de curva de morte, no caldo Muller-Hinton ou plasma/soro, leite, entre outros, a depender do agente a ser estudado (ZHANG *et al.*, 2022). Assim, o efeito do antibiótico (redução na contagem bacteriana, expressada em unidades formadoras de colônia – UFC) é avaliado pela equação de Hill, descrevendo um modelo Sigmoide E_{max} (EQUAÇÃO 1), ao longo de 24 horas de tratamento (LEES; SHOJAEI; TOUTAIN, 2004; MOUTON *et al.*, 2012).

$$E = E_0 + \frac{E_{max} \times X^N}{EC_{50}^N + X^N} \quad (1)$$

onde E_0 é o crescimento bacteriano após 24 horas de incubação na ausência de antibiótico subtraído do inóculo inicial, é expresso como $\log_{10}$ UFC/mL; E_{max} é a inibição máxima do crescimento bacteriano, determinada como a mudança da contagem inicial em $\log_{10}$ UFC/mL em 24 horas de incubação com o fármaco; X é a variável independente (o índice PK/PD), e N é o coeficiente de Hill, que descreve a inclinação da curva; EC_{50} é o valor do índice PK/PD que produz 50% do efeito antibacteriano máximo (LEES *et al.*, 2015). O coeficiente de regressão (R^2) deve ser aplicado para avaliar a relação entre parâmetros PK/PD e efeito antibacteriano (FIGURA 7); quanto maior o valor de R^2 , mais correlacionados com os parâmetros PK/PD o efeito estará (ZHANG *et al.*, 2022).

Figura 7- Representação da relação de colistina e *P. aeruginosa* para cada um dos índices PK/PD



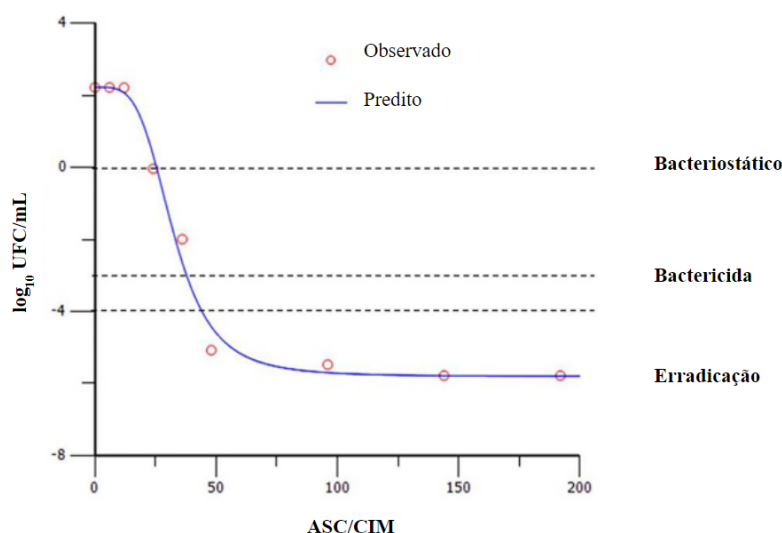
Legenda: As linhas representam o ajuste das funções sigmóides E_{max} para cada um dos índices PK/PD: A) ASC. Área sob a curva concentração-tempo dividida pela concentração inibitória mínima (CIM), B) $C_{máx}/CIM$. Concentração máxima dividida pela CIM e C) $T>CIM$ Tempo em que a concentração do fármaco esteve acima da CIM; f , fração livre. Para cada um dos índices PK/PD foi apresentado o coeficiente de regressão (R^2).

Fonte: Adaptado de Dudhani *et al.* (2010)

Por meio desta equação, a magnitude do índice PK/PD, ou seja, o alvo (*target*) farmacocinético/farmacodinâmico (PDT), pode ser quantificado em três níveis de inibição de crescimento: ação bacteriostática, ação bactericida e erradicação bacteriana, (FIGURA 8). Os valores de para ações bacteriostáticas, bactericidas e de erradicação são definidos como aqueles valores que produzem $E = 0$ (nenhuma alteração na contagem bacteriana após 24 h de

incubação), $E = 3$ (uma redução de 3 log ou 99,9% da contagem inicial do inóculo após 24 h de incubação) e $E = 4$ (uma redução de 4 log ou 9,99 % da contagem bacteriana do inóculo inicial) (NIELSEN; FRIBERG, 2013).

Figura 8 - Gráfico de exemplo de ASC24h/CIM versus alteração na contagem bacteriana desde a contagem inicial ($\log_{10}$ CFU/mL).



Fonte: Adaptado de Dorey *et al.* (2017).

Legenda: ASC24h/CIM. Área sob a curva de 24 horas dividida pela concentração inibitória mínima.

Muitos estudos foram realizados de forma a determinar os índices PK/PD para diversas classes de antibióticos. A eficácia de antibióticos tempo-dependentes ($T > CIM$) depende da concentração do fármaco manter-se acima da CIM por um determinado tempo entre o intervalo das administrações, os beta-lactâmicos são os principais representantes deste grupo. Já para os concentração-dependentes (C_{max}/CIM) a eficácia está relacionada como o fármaco atingir uma concentração muito elevada; estes são representados pelos aminoglicosídeos e quinolonas. Também tem os antibióticos tempo e concentração-dependentes (ASC/CIM), que como exemplo tem as tetraciclina e macrolídeos (ASÍN-PRÍETO; RODRÍGUEZ-GASCÓN; ISLA, 2015; RODRÍGUEZ-GASCÓN; SOLÍNÍS; ISLA, 2021).

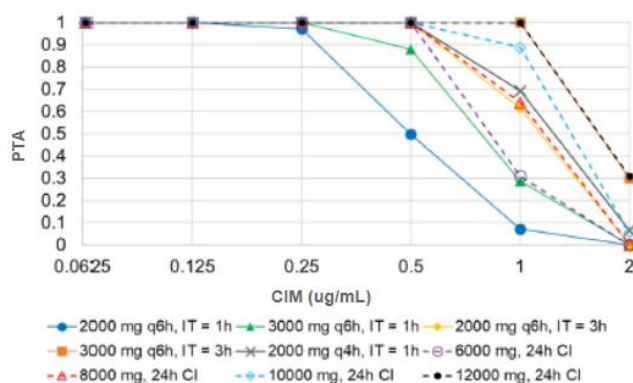
Apesar dos índices PK/PD terem sido determinados para as classes de antibióticos, alguns autores comprovaram que esses índices podem variar dentro das classes, de acordo com o agente e a forma em que é determinado. Isso foi demonstrado no estudo de Lees *et al.* (2015) que avaliaram a curva de morte bacteriana de *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* frente a amoxicilina em dois meios (caldo Mueller-Hinton e soro de bezerros). Neste estudo *M.*

haemolytica apresentou comportamento concentração-dependente em ambos os meios, assim como *P. multocida* no soro, contrariando o que já foi descrito por Craig (2003), que classificou as penicilinas de uma forma geral como tempo-dependentes. Assim, devido ao comportamento co-dependente frente a amoxicilina, para essas espécies o índice PK/PD mais adequado para prever a eficácia passa a ser a ASC/CIM (NIELSEN; FRIBERG, 2013).

Os dados de PDT nem sempre estão disponíveis na Medicina Veterinária, assim, o valor do PDT pode ser extrapolado de estudos com Seres Humanos. Isso é válido pois o PDT não depende das características do animal; tendo uma validade genérica entre as espécies animais. Porém, os dados farmacocinéticos são necessários para definir as doses necessárias para atingir PDT (TOUTAIN *et al.*, 2021).

Com o PDT estabelecido é possível determinar a probabilidade de uma certa população atingir o PDT. A probabilidade de que um valor específico do índice PK/PD associado à eficácia do antibiótico seja alcançado em uma determinada CIM é definida como a probabilidade de atingir o alvo (PTA) (RODRÍGUEZ-GASCÓN; SOLINÍS; ISLA, 2021). O PTA é determinado a partir de simulações, sendo mais fidedigno quando as variações inter e intraindividuais são levadas em consideração. A simulação de Monte Carlo é uma ferramenta de modelagem estatística avançada que permite expandir o tamanho da amostra considerando a variabilidade dos parâmetros PK na estimativa dos índices PK/PD para fornecer previsões do resultado de diferentes abordagens terapêuticas, ou a determinação do PTA. O PTA corresponde à porcentagem de pacientes simulados com índice PK/PD estimado igual ou superior ao PDT, uma representação gráfica pode ser observada na figura 9 (ASÍN-PRIETO; RODRÍGUEZ-GASCÓN; ISLA, 2015; ROBERTS; KIRKPATRICK; LIPMAN, 2011). Regimes de dosagem potencialmente eficazes devem fornecer um $PTA \geq 90\%$ (EMA, 2016b).

Figura 9- Representação gráfica da Probabilidade de Atingir o Alvo (PTA)



Legenda: Probabilidade de atingir o alvo (PTA) para vários regimes de dosagem de cloxacilina simulados. O alvo PK/PD foi de 50% $fT > MIC$; CI, infusão contínua; IT, infusão intermitente.

Fonte: Adaptado de Courjon *et al.* (2020)

2.4. Integração farmacocinética/farmacodinâmica para otimização do regime de doses de antimicrobianos

A otimização do uso de antimicrobianos em animais e seres humanos está em foco devido à preocupação global com a resistência antibacteriana, um dos dez principais problemas globais que ameaçam a saúde pública. Em 2015 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um Plano de Ação Global em Resistência Antimicrobiana, sendo a otimização uma das estratégias (WHO, 2015; ZHU; HUANG; YANG, 2022).

A *Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products* (EMA/CHMP/594085/2015) da EMA (2016) estabelece a utilização da integração PK/PD para determinação de regimes de dose com melhor potencial de eficácia terapêutica. Além disso, orienta os pontos a serem considerados de forma a determinar um adequado regime de doses. A otimização é baseada no conhecimento da relação antimicrobiano e agente, de forma a integrar a concentração inibitória mínima (CIM) e índices PK/PD nas simulações *in silico*, utilizando simulações de Monte Carlo para determinar a probabilidade de atingir o alvo, estabelecendo se o regime é eficiente ou não.

Pontos a serem considerados para determinação/otimização de regimes de dosagem:

- Aspectos microbiológicos: distribuição populacional da CIM e curva de morte bacteriana, os quais darão suporte para conhecimento da relação entre exposição e efeito antimicrobiano;
- Determinação do índice PK/PD e do PDT a partir de estudos não clínicos;

- Dados de PK da população alvo (estudos clínicos);
- Determinação do PTA a partir de simulações;
- Avaliação das relações exposição-resposta clínica (E-R) usando dados que são coletados durante os estudos clínicos que avaliam os resultados clínicos e microbiológicos em pacientes.

2.5. *Staphylococcus* spp.

2.5.1. Aspectos Gerais

Staphylococcus spp. são bactérias do gênero *Staphylococcus*, são cocos gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase positivo, imóveis e não formadores de esporo (LEROY; VERMASSEN; TALON, 2015). O gênero *Staphylococcus* é composto por mais de 50 espécies, sendo que muitas delas possuem subespécies, além disso, é dividido em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo (CoPS) e *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS), a depender do resultado obtido no teste da coagulase (FTHENAKIS *et al.*, 2019). O gênero *Staphylococcus* possui distribuição mundial, grande parte das espécies deste gênero colonizam a pele e mucosas dos seres humanos, outros mamíferos e aves, bem como o ambiente, devido sua adaptabilidade (BIEROWIEC *et al.*, 2019; VRBOVSKÁ *et al.*, 2020).

Sabe-se que o compartilhamento de microbioma não patogênico e patogênico ocorre entre os seres humanos, animais e o ambiente (TRINH *et al.*, 2018). Visto que há estudos que demonstraram o compartilhamento de microbioma entre casais (ROSS; DOXEY; NEUFELD, 2017), entre tutores e seus animais de companhia (MISIC *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2013), com contato direto ou habitação próxima de fazendas de animais de produção (KRAEMER *et al.*, 2018; MOSITES *et al.*, 2017) e devido ingestão de alimentos contaminados (BADAWY *et al.*, 2022). Embora a maioria das espécies de *Staphylococcus* sejam inofensivas algumas como a *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, podem causar infecções primárias ou oportunistas em seus hospedeiros, além de poderem atuar como reservatórios de genes de resistência, aumentando a probabilidade de uma falha na terapia antimicrobiana (ROSSI; ANDRADE-OLIVEIRA; GIAMBIAGI-DEMARVAL, 2019).

O compartilhamento de genes de resistência, principalmente de resistência a meticilina (gene *mecA*), entre animais, seres humanos e ambiente é um importante problema para a saúde pública, em consequência da disseminação da resistência antimicrobiana (ARGUDÍN *et al.*, 2017; GRAHAM *et al.*, 2019; LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Assim, torna-se necessário a compreensão de patógenos zoonóticos e a resistência a antibióticos, além da adoção do bom uso dos antimicrobianos na medicina humana e animal (DAFALE *et al.*, 2020).

2.5.2. Espécies de *Staphylococcus* de importância na Medicina Veterinária

As espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo, representadas por *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius*, sendo as últimas três conhecidas como grupo SIG (*Staphylococcus intermedius* group), apresentam maior relevância clínica na Medicina Veterinária (ABUSLEME *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2016). Do grupo SIG, *S. pseudintermedius* é a espécie mais comum associada a infecções em animais, particularmente em cães (MALIŠOVÁ *et al.*, 2019).

A espécie *Staphylococcus aureus* é a mais importante do gênero, tendo grande relevância na saúde pública (YU *et al.*, 2016). *S. aureus* tem a capacidade de evadir do sistema imune e, consequentemente, causar bacteremia e adentrar em tecidos profundos, desencadeando uma variedade de infecções, superficiais e/ou invasivas, como as endocardites e osteomielites, e até mesmo septicemia e morte (POLLITT *et al.*, 2018). Na Medicina Veterinária, está associado a formação de abscessos, mastite, pneumonia e meningite (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017). Infecção por *S. aureus* é de grande relevância em animais de produção, apesar de se ser um agente comum a microbiota da pele dos tetos, devido seu potencial patogênico pode adentrar ao canal do teto e levar a uma infecção, sendo um dos principais agentes causadores de mastite subclínica, clínica e gangrenosa em vacas, cabras e ovelhas (ALGAMMAL *et al.*, 2020; CAPOFERRI *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2020). Também está associado a abscessos em diversas espécies, principalmente caprinos e ovinos (YEBRA *et al.*, 2021). Entretanto, a grande preocupação com *S. aureus* é a resistência antimicrobiana presente nesta espécie, de forma que *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) é um dos principais problemas de saúde pública a nível global (MOGLAD; ALTAYB, 2022).

S. pseudintermedius é um agente comum a microbiota nasal e da pele de cães, gatos e seres humanos (ABDULLAHI *et al.*, 2022). É o principal agente causador de piodermite em

cães (ABOUELKHAIR *et al.*, 2019; BERTELLONI; CAGNOLI; EBANI, 2021) além de causar otite externa, bem como infecções sistêmicas nos trato urinário, respiratório e trato reprodutivo (LYNCH; HELBIG, 2021). Em humanos causa infecções esporádicas, porém, tem sido realizado estudos que demonstram que há compartilhamento de *S. pseudintermedius* entre seres humanos e seus animais (FERENCE *et al.*, 2019; LOZANO *et al.*, 2017), ou infecção em seres humanos por meio de mordida (BÖRJESSON *et al.*, 2015; KALNINS *et al.*, 2022), sendo um agente com potencial zoonótico. *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) também se tornou um problema de saúde global na medicina veterinária, assim como *S. aureus* resistente à meticilina, sendo ambos de relevância zoonótica (ABDULLAHI *et al.*, 2022).

Apesar das espécies CoPS apresentarem maior relevância clínica, as espécies CoNS têm despertado a atenção de pesquisadores e clínicos por estarem se mostrando patogênicas, estando principalmente associadas a emergência de infecções nosocomiais (ARGEMI *et al.*, 2019; HEILMANN; ZIEBUHR; BECKER, 2019). Na medicina humana *S. epidermidis* está associada a sepse em bebês prematuros hospitalizados, principalmente quando imunossuprimidos, sendo os cateteres contaminados a principal fonte de infecção (JOUBERT *et al.*, 2022). Também há estudos na Medicina Veterinária com cães, caprinos, ovinos e bovinos hospitalizados demonstrando o risco de infecção por cateter contaminado e as possíveis complicações, como bacteremia e posterior septicemia, as quais deverão ser tratadas com terapia antimicrobiana sistêmica (GUZMÁN RAMOS *et al.*, 2018; KING; BYRNE; CHIGERWE, 2020).

Na Medicina Veterinária *S. epidermidis* está associado a casos de mastite, causando infecções persistentes, danos nos tecidos do úbere e aumento da contagem de células somáticas (CCS), diminuindo a qualidade do leite (RAJAMANICKAM *et al.*, 2020). Consequentemente, esta espécie apresenta relevância, quanto a agente causador de mastite, nas espécies ovina (FTHENAKIS *et al.*, 2019), bovina (PEREIRA DE OLIVEIRA *et al.*, 2022) e caprina (ROSA *et al.*, 2022).

2.5.3. Importância de *Staphylococcus* spp. na caprinocultura

Staphylococcus spp., principalmente *Staphylococcus* não aureus, são os principais agentes envolvidos nas mastites, clínica e subclínica em cabras (ROSA *et al.*, 2022). Estes causam infecções intramamárias persistentes, resultando em maior contagem de células somáticas (CEC), além do surgimento de resistência antimicrobiana, e são considerados ser

reservatórios de genes de resistência com potencial transmissão para outras espécies (SANTOS *et al.*, 2020). Devido o contato entre mãe e filhote ocorre o compartilhamento de microbioma, caso este filhote apresente-se imunossuprimido, espécies de *Staphylococcus* podem levar a uma infecção, como é comum em neonatos de outras espécies, principalmente equinos (TOOMBS-RUANE *et al.*, 2016).

Como Silva *et al.* (2018) demonstraram, nem todo abscesso em pequenos ruminantes é Linfadenite Caseosa, causado por *C. pseudotuberculosis*. Cerca de 30% dos isolados de abscessos são identificadas outras espécies de bactérias (AL-GAABARY *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2011). Em um estudo realizado por Souza *et al.* (2011) foi demonstrado que abscessos causados por *Staphylococcus aureus* apresentam aspectos histopatológicos semelhantes aos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *S. aureus* subsespécie *anaerobius* foi identificado como o agente causador da doença de Morel, que também causa abscessos subcutâneos (SLOSARKOVA *et al.*, 2019; SZALUŚ-JORDANOW *et al.*, 2018).

Além disso, também foi relatado um caso de aborto em cabra associado a infecção por *S. aureus*. O mesmo estudo demonstrou o potencial zoonótico do agente pois três dos Médicos Veterinários envolvidos no caso apresentaram infecção na pele por *S. aureus* (PIVA *et al.*, 2021).

2.5.4. *Staphylococcus* metilina-sensível (MSSA)

Apesar da emergência a resistência antimicrobiana, principalmente associada a resistência de *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* à metilina, ainda existem cepas sensíveis a esses fármacos (TSIRIGOTAKI *et al.*, 2022). Em uma Guideline de Endocardite Infeciosa da *European Society of Cardiology* e a *American Heart Association* recomendaram o tratamento de MSSA com antibióticos beta-lactâmicos antiestafilocócicos (AAS), como a nafcillina, cloxacilina e a cefazolina, sendo a última uma cefalosporina de primeira geração (BADDOUR *et al.*, 2015; HABIB *et al.*, 2016; MCDANEL *et al.*, 2017). A utilização de vancomicina deve ficar restrita aos casos de MRSA (CASTAÑEDA *et al.*, 2021).

Muitos pesquisadores têm avaliado a utilização de ceftriaxona ao invés de AAS, demonstrando efeito similar, com menos efeitos adversos e protocolos mais práticos (TELLES *et al.*, 2021; YETMAR *et al.*, 2022). Entretanto, para casos na Medicina Veterinária, deve-se priorizar o uso de AAS frente a terceira geração de cefalosporina, pois este é um antibiótico de prioridade para o tratamento de infecções em seres humanos (OMS, 2019).

2.2. Cloxacilina

Os beta-lactâmicos são antibióticos que possuem em comum o anel beta-lactâmico em sua estrutura, o que determina seu mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular) e a sua baixa toxicidade, pois atuam na parede celular, estrutura presente somente nas bactérias, e seu principal mecanismo de resistência (produção de betalactamases). Fazem parte desta família as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

A cloxacilina é uma isoxazolilpenicilina, assim como a oxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina. Devido a presença de halogênios nesses compostos potencializa a atividade antibacteriana e aumenta sua absorção no nível gastrointestinal, possuindo ação contra bactérias Gram-positivas, excelente atividade contra *Staphylococcus* produtores de penicilinases, mas não apresentam atividade contra bacilo Gram negativo (KALESHWARI *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2020).

Assim como as penicilinas G (cristalina – sódica ou potássica, procaína e benzatina) a cloxacilina também pode ser apresentada na forma de sais (cloxacilina sódica ou benzatina). As penicilinas G cristalinas possuem meia-vida curta, cerca de 30 minutos, sendo necessário realizar várias administrações para manter a concentração sérica do fármaco. Portanto, em consequência disto, foram desenvolvidas as penicilinas procaína e benzatina, de uso intramuscular, e conhecidas como penicilinas de depósito ou de liberação. A atividade delas é a mesma, por apresentarem o mesmo princípio ativo, porém, a farmacocinética é diferente, devido a solubilidade alterada de acordo com o sal administrado (PEDROSO *et al.*, 2001).

Quando associada a procaína ou benzatina a solubilidade é diminuída, o que torna a liberação do fármaco no local de aplicação mais lenta, além de manter a concentração sérica por um período prolongado, assim, o intervalo entre administrações é maior. A solubilidade da procaína em água é de 0,4%, o que acarreta uma meia vida de 12 hora, enquanto a solubilidade da benzatina é de 0,02%, resultando em uma meia vida de 336 horas, porém, a concentração sérica atingida é inferior quando comparada as outras penicilinas G. Portanto, devido a alteração na solubilidade, há uma diferença no parâmetro farmacocinético constante de absorção (K_a) entre as formulações, quanto menos hidrossolúvel, menor a K_a (PETRI, 2015).

Quanto maior a lipofilicidade, mais forte será a ligação com as proteínas plasmáticas. Assim, a ligação às proteínas plasmáticas das isoxazolilpenicilinas (cloxacilina e oxacilina) é de cerca de 90%, enquanto a da penicilina e da amoxicilina corresponde a 60% e 30%,

respectivamente (LIMA *et al.*, 2020). Rolinson e Sutherland (1965) realizaram um estudo para avaliação da ligação a proteínas de vários antibióticos, assim, foi comparada a fração livre entre as Benzilpenicilina e a cloxacilina no plasma de várias espécies, como demonstrado no quadro 1.

Quadro 1- Fração não ligada (%) de benzilpenicilina e cloxacilina à proteína sérica em diferentes espécies

Espécie	Benzilpenicilina	Cloxacilina
Humano	49	6,5
Cavalo	65	30
Ovelha	70	19,5
Coelho	65	22
Bezerro	63	25

Fonte: Adaptado de Rolinson e Sutherland (1965)

A cloxacilina é frequentemente utilizada, via intramamária, no tratamento de mastites (LANGONI *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2020), existindo muitos estudos farmacocinéticos nesta área, estando associados a estudos de resíduos em leite e tecido (BURMAŃCZUK *et al.*, 2017; KIETZMANN; NIEDORF; GOSSELLIN, 2010). Porém, seu uso para outras afecções, na Medicina Veterinária, é pouco estudado, sendo pouco os estudos de farmacocinética publicados na literatura. Dimitrova, da faculdade de medicina veterinária (Trakia University) da Bulgária, realizou alguns estudos com isoxazolilpenicilinas nas espécies canina, felina, suína e ovina (LASHEV; DIMITROVA, 2008). A tabela 1 apresenta os artigos publicados na literatura com estudos farmacocinéticos de cloxacilina na Medicina Veterinária.

Tabela 1- Estudos de farmacocinética de cloxacilina na medicina veterinária

Espécie	Base farmacológica	Via de administração	Autor	Ano de publicação
Felino	CLOX sódica	Intravenosa e Intramuscular	Dimitrova, D. J.	1997
Suíno	CLOX sódica	Intravenosa e Intramuscular	Dimitrova et al.	1997
Ovina	CLOX sódica	Intravenosa e Intramuscular	Dimitrova et al.	2001
Canina	CLOX sódica	Intravenosa	Dimitrova, D. J.	2001
Bovino	CLOX benzatina	Intramamária	Kietzmann et al.	2010
Cabra	CLOX sódica	Intravenosa	Khargharia et al.	2013
Bovino	CLOX sódica	Intramamária	Burmańczuk et al.	2017
Bovino	CLOX benzatina	Intramamária	Grabowski et al.	2018
Ovelha	CLOX sódica - amoxicilina	Intravenosa e Intramuscular	Kaleshwari et al.	2019
Bovino	CLOX + <i>Aloe vera</i>	Intramamária	Forno-Bell et al.	2021
Equino	CLOX-ampicilina	Intravenosa	Kondampati et al.	2022

Legenda: CLOX. cloxacilina

Ao analisar a lista de antibióticos críticos na medicina humana, que classifica os antibióticos em máxima prioridade, grande prioridade, muito importantes e importante, a cloxacilina (penicilinas antiestafilocócicas) enquadra-se nos antibióticos de importância crítica (OMS, 2019). Assim, comparado com outras classes de antibióticos, seu uso deve ser priorizado medicina veterinária, sendo necessário o conhecimento da farmacocinética/farmacodinâmica em diversas espécies, vias de administração e agente infeccioso.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, I. N. *et al.* Nasal *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: a systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. **Journal of applied microbiology**, v. 133, n. 6, 1 dez. 2022.
- ABOUELKHAIR, M. A. *et al.* Identification, cloning and characterization of SpEX exotoxin produced by *Staphylococcus pseudintermedius*. **PloS one**, v. 14, n. 7, 1 jul. 2019.
- ABUSLEME, F. *et al.* Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated in a veterinary teaching hospital in Chile. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 54, n. 3, p. 192–202, 1 jul. 2022.
- AL-GAABARY, M. H. *et al.* Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1–3, p. 117–124, nov. 2010.
- ALGAMMAL, A. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255–3265, 2020.
- ARGEMI, X. *et al.* Molecular Sciences Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1215, p. 2-19, 2019.
- ARGUDÍN, M. A. *et al.* Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v. 6, n. 12, p. 38, 2017.
- ASÍN-PRIETO, E.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; ISLA, A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 319–329, 2015.
- BADAWY, B. *et al.* Ecological Distribution of Virulent Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in Livestock, Environment, and Dairy Products. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 11, p. 1651, 18 nov. 2022.
- BADDOUR, L. M. *et al.* Infective endocarditis in adults: Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: A scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 132, n. 15, p. 1435–1486, 13 out. 2015.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, p. ftx005, 2017.
- BERTELLONI, F.; CAGNOLI, G.; EBANI, V. V. Virulence and Antimicrobial Resistance in Canine *Staphylococcus* spp. Isolates. **Microorganisms**, v. 9, n. 515, p. 1–11, 2021.
- BHAGUNDE, P. *et al.* A translational pharmacokinetic/pharmacodynamic model to characterize bacterial kill in the presence of imipenem-relebactam. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 89, p. 55–61, 1 dez. 2019.
- BIEROWIEC, K. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus* species colonization in healthy and sick cats. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

BON, C. *et al.* Mathematical modeling and simulation in animal health. Part III: Using nonlinear mixed-effects to characterize and quantify variability in drug pharmacokinetics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 2, p. 171–183, 1 abr. 2018.

BÖRJESSON, S. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 839–844, 19 mar. 2015.

BRCAST. DOCUMENTOS / SUBCOMITÊ VETERINÁRIA / DOCUMENTOS.

BURMAŃCZUK, A. *et al.* Determination of cloxacillin residues in dairy cows after intramammary administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 5, p. 552–560, 1 out. 2017.

CAPOFERRI, R. *et al.* Comparison of the response of mammary gland tissue from two divergent lines of goat with high and low milk somatic cell scores to an experimental *Staphylococcus aureus* infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 234, 1 abr. 2021.

CASTAÑEDA, X. *et al.* Effectiveness of vancomycin plus cloxacillin compared with vancomycin, cloxacillin and daptomycin single therapies in the treatment of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a rabbit model of experimental endocarditis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 6, p. 1539–1546, 12 maio 2021.

CAVALHEIRO, A. H.; COMARELLA, L. Farmacocinética: modelos e conceitos – uma revisão de literatura. **Revista Saúde e Desenvolvimento** |, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2016.

CHATURVEDULA, A. *et al.* Artificial Intelligence and Pharmacometrics: Time to Embrace, Capitalize, and Advance? **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 8, n. 7, p. 440–443, 1 jul. 2019.

CLSI. **VET01 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition**. 5. ed. Pennsylvania: CLSI, 2018.

COURJON, J. *et al.* A Population Pharmacokinetic Analysis of Continuous Infusion of Cloxacillin during *Staphylococcus aureus* Bone and Joint Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, 1 dez. 2020.

DAFALE, N. A. *et al.* Zoonosis: An Emerging Link to Antibiotic Resistance Under “One Health Approach”. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 139–152, 2020.

DOREY, L. *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of florfenicol for the pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177568, 1 maio 2017.

DUDHANI, R. V. et al. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1117–1124, mar. 2010.

EMA. Guideline for the demonstration of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances (EMA/CVMP/627/2001-Rev.1). **EMA. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)**, v. 1, p. 18, 21 jan. 2016a.

EMA. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CHMP/594085/2015). **EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)**, p. 17, 21 jul. 2016b.

EMA. Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections (CPMP/EWP/558/95 Rev 3). p. 30, 19 maio 2022.

EUCAST. Implications of breakpoints splitting the wild type and/or resistant populations.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93–120, 1 jan. 2014.

FDA. **Population Pharmacokinetics Guidance for Industry**. New Hampshire: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugsand/or>>.

REFERENCE, E. H. et al. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. **International forum of allergy & rhinology**, v. 9, n. 7, p. 724–729, 1 jul. 2019.

FTHENAKIS, G. C. et al. Role of Staphylococci in mastitis in sheep. **Journal of Dairy Research**, v. 86, p. 254–266, 2019.

GRAHAM, D. W. et al. Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1441, n. 1, p. 17–30, 29 abr. 2019.

GUARDABASSI, L. et al. Optimization of Antimicrobial Treatment to Minimize Resistance Selection. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 3, jun. 2018.

GUZMÁN RAMOS, P. J. et al. Incidence of and associated factors for bacterial colonization of intravenous catheters removed from dogs in response to clinical complications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 3, p. 1084–1091, 1 maio 2018.

HABIB, G. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). **European Heart Journal**, v. 36, n. 44, p. 3075–3123, 21 nov. 2016.

HANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016. v. 1

HASAN, M. R. *et al.* Application of Mathematical Modeling and Computational Tools in the Modern Drug Design and Development Process. **Molecules** **2022**, Vol. **27**, Page **4169**, v. 27, n. 13, p. 4169, 29 jun. 2022.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative Staphylococci virulent? **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1071–1080, 1 set. 2019.

INNES, G. K. *et al.* External Societal Costs of Antimicrobial Resistance in Humans Attributable to Antimicrobial Use in Livestock. **Annual Review of Public Health**, v. 41, p. 141–157, 2020.

JANSSEN, A.; BENNIS, F. C.; MATHÔT, R. A. A. Adoption of Machine Learning in Pharmacometrics: An Overview of Recent Implementations and Their Considerations. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, 1 set. 2022.

JORDA, A.; ZEITLINGER, M. Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Studies and Clinical Trials in the Drug Development Process of EMA-Approved Antibacterial Agents: A Review. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, p. 1071–1084, 2020.

JOUBERT, I. A. *et al.* Look Who's Talking: Host and Pathogen Drivers of Staphylococcus epidermidis Virulence in Neonatal Sepsis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 2, 1 jan. 2022.

KALESHWARI, L. *et al.* Pharmacokinetics of amoxicillin and cloxacillin following single dose intravenous and intramuscular administration in sheep. **Haryana Veterinarian**, v. 58, n. 2, p. 185–189, dez. 2019.

KALNINS, N. J. *et al.* Antimicrobials in dog-to-dog bite wounds: A retrospective study of 1526 dog bite events (1999-2019). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 36, n. 6, p. 2028–2041, 1 nov. 2022.

KASICHAYANULA, S.; VENKATAKRISHNAN, K. Reverse Translation: The Art of Cyclical Learning. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, n. 2, p. 152–159, 1 fev. 2018.

KIETZMANN, M.; NIEDORF, F.; GOSSELLIN, J. Tissue distribution of cloxacillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. **BMC Veterinary Research**, v. 6, 6 out. 2010.

KING, A.; BYRNE, B. A.; CHIGERWE, M. Prevalence of and risk factors for intravenous catheter infection in hospitalized cattle, goats, and sheep. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 34, n. 1, p. 330–338, 1 jan. 2020.

KRAEMER, J. G. *et al.* Influence of Pig Farming on the Human Nasal Microbiota: Key Role of Airborne Microbial Communities. 2018.

- LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, 1 out. 2018.
- LANDERSDORFER, C. B.; NATION, R. L. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. 770518, p. 9, 29 out. 2021.
- LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 1 nov. 2017.
- LASHEV, L.; DIMITROVA, D. J. Comparative allometric analysis of three isoxazolylpenicillins in four mammalian species. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, n. 4, p. 273, 2008.
- LEES, P. *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of amoxicillin for the calf pathogens *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 457–470, 1 out. 2015.
- LEES, P. *et al.* Pharmacokinetic–pharmacodynamic integration and modelling of oxytetracycline for the calf pathogens *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 28–38, 1 fev. 2018.
- LEES, P.; SHOJAEI, F.; TOUTAIN, P. L. PK-PD modelling: An alternative to dose titration studies for antimicrobial drug dosage selection. **Regulatory Affairs Journals**, p. 175–180, 2004.
- LEITE, J. A. B. *et al.* Efficacy of three methods used to control staphylococcal mastitis in dairy goats. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, p. 2825–2831, 1 dez. 2020.
- LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. Em: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 140–145.
- LIMA, L. M. *et al.* β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, 15 dez. 2020.
- LIN, Z. *et al.* Mathematical modeling and simulation in animal health – Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, n. 5, p. 421–438, 2016.
- LOZANO, C. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 4, p. 268–270, 1 abr. 2017.
- LUO, W. *et al.* Pharmacokinetics/Pharmacodynamics models of veterinary antimicrobial agents. **Journal of Veterinary Science**, v. 20, n. 5, 2019.
- LYNCH, S. A.; HELBIG, K. J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? 2021.

MALIŠOVÁ, L. et al. Correct species identification (reclassification in CNCTC) of strains of *Staphylococcus intermedius*-group can improve an insight into their evolutionary history. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 231–236, 2019.

MARTÍN, B. S. et al. Optimization of florfenicol dose against *Piscirickettsia salmonis* in *Salmo salar* through PK/PD studies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 1 maio 2019.

MCCOMB, M.; BIES, R.; RAMANATHAN, M. Machine learning in pharmacometrics: Opportunities and challenges. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 1482–1499, 1 fev. 2022.

MCDANEL, J. S. et al. Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**®, v. 100, n. 1, p. 100–106, 2017.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162–171, 1 jan. 2014.

MI, K. et al. Application of Semi-Mechanistic Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Model in Antimicrobial Resistance. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, 1 fev. 2022.

MISIC, A. M. et al. The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. **Microbiome**, v. 3, n. 1, 23 jan. 2015.

MODY, H. et al. A Review on Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathophysiological Mechanisms, Drug Classes, Clinical Management, and Recent Advances in Mathematical Modeling and Simulation Approaches. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 9, n. 8, p. 896–909, 1 nov. 2020.

MOGLAD, E. H.; ALTAYB, H. N. Antibigram, prevalence of methicillin-resistant and multi-drug resistant *Staphylococcus* spp. in different clinical samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 12, p. 103432, 1 dez. 2022.

MOSITES, E. et al. Microbiome sharing between children, livestock and household surfaces in western Kenya. 2017.

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 1, n. 1, 2012.

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development - Part 2: Introduction to pharmacokinetic modeling methods. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 2, n. 4, abr. 2013.

MOUTON, J. W. et al. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: An update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 601–607, maio 2005.

MOUTON, J. W. *et al.* The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, 2012.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

NIELSEN, E. I.; CARS, O.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: A step toward model-based dose optimization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4619–4630, out. 2011.

NIELSEN, E. I.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 1053–1090, jul. 2013.

OMS. **Lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana (lista OMS de AIC)**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/325037>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

PAPICH, M. G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 480–486, 16 jul. 2014.

PEDROSO, M. C. *et al.* Penicillin G benzathine: characteristic of prescription and use in community pharmacy. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 661–664, 2001.

PEREIRA DE OLIVEIRA, R. *et al.* Diversity and emergence of multi-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from subclinical mastitis in cows in of the state of Piauí, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 2215–2222, 2022.

PETRI, W. A. Penicillins, Cephalosporins, and Other β Lactam Antibiotics. Em: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Eds.). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. [s.l.] The McGraw-Hill Companies, 2015.

PIVA, S. *et al.* Epidemiologic case investigation on the zoonotic transmission of *Staphylococcus aureus* infection from goat to veterinarians. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 6, p. 684–690, 1 set. 2021.

POLLITT, E. J. G. *et al.* *Staphylococcus aureus* infection dynamics. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007112, 1 jun. 2018.

RAJAMANICKAM, K. *et al.* Enhancing Drug Efficacy against Mastitis Pathogens-An *in vitro* Pilot Study in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Animals**, v. 10, n. 2117, p. 15, 2020.

RAWSON, T. M. *et al.* Optimizing antimicrobial use: challenges, advances and opportunities. **Nature Reviews**, v. 19, p. 747–758, dez. 2021.

ROBERTS, J. A.; KIRKPATRICK, C. M. J.; LIPMAN, J. Monte Carlo simulations: maximizing antibiotic pharmacokinetic data to optimize clinical practice for critically ill patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 227–231, 2011.

ROBERTS, J. A.; TACCONE, F. S.; LIPMAN, J. Understanding PK/PD. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1797–1800, 1 nov. 2016.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; SOLINÍS, M. Á.; ISLA, A. The Role of PK/PD Analysis in the Development and Evaluation of Antimicrobials. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 833, p. 27, 2021.
ROLINSON, G. N.; SUTHERLAND, R. The binding of antibiotics to serum proteins. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 25, n. 3, p. 638–650, 1965.

ROSA, N. M. *et al.* Species identification by MALDI-TOF MS and gap PCR-RFLP of non-aureus *Staphylococcus*, *Mammaliicoccus*, and *Streptococcus* spp. associated with sheep and goat mastitis. **Veterinary Research**, v. 53, p. 84, 2022.

ROSS, A. A.; DOXEY, A. C.; NEUFELD, J. D. The Skin Microbiome of Cohabiting Couples. **mSystems**, v. 2, n. 4, 29 ago. 2017.

ROSSI, C. C.; ANDRADE-OLIVEIRA, A. L.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. CRISPR tracking reveals global spreading of antimicrobial resistance genes by *Staphylococcus* of canine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 232, p. 65–69, 1 maio 2019.

SANTOS, A. D. S. *et al.* Antimicrobial resistance profile of non-aureus *Staphylococci* isolates from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast region of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 3, p. 290–294, 1 ago. 2020.

SCHEETZ, M. H. *et al.* Of rats and men: A translational model to understand vancomycin pharmacokinetic/toxicodynamic relationships. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 10, 1 out. 2021.

SCHNEIDER, B. *et al.* Model-based reverse translation between veterinary and human medicine: The one health initiative. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 65–68, 1 fev. 2018.

SILVA, R. M. M. *et al.* Not all abscesses in small ruminants are caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1902–1908, 1 out. 2018.

SLOSARKOVA, S. *et al.* New sequence type ST3756 of *Staphylococcus aureus* subspecies *anaerobius* as the causative agent of abscessing lymphadenitis in sheep. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 112–116, 1 abr. 2019.

SONG, J. *et al.* Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. **elifelife.org Song et al. eLife**, v. 2, p. 458, 2013.

SOUZA, M. DE F. *et al.* Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras**, v. 31, n. 3, p. 224–230, 2011.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**20, v. 27, n. 2, p. 116–129, 2009.

SZALUŚ-JORDANOW, O. *et al.* MLST and RAPD molecular analysis of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats in Poland. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 1407–1410, 2018.

TELLES, J. P. *et al.* Ceftriaxone and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: a perspective from pharmacokinetics/pharmacodynamics studies. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1951221>, v. 17, n. 9, p. 1039–1048, 2021.

TOOMBS-RUANE, L. J. *et al.* Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from neonatal foal samples submitted to a New Zealand veterinary pathology laboratory (2004 to 2013). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 64, n. 2, p. 107–111, 3 mar. 2016.

TOUTAIN, P. L. *et al.* The pharmacokinetic/pharmacodynamic paradigm for antimicrobial drugs in veterinary medicine: Recent advances and critical appraisal. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** John Wiley and Sons Inc, v. 44, n. 2, p. 172–200. 1 mar. 2021.

TRINH, P. *et al.* One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. **Frontiers in Public Health**, v. 6, 30 ago. 2018.

TSIRIGOTAKI, M. *et al.* Predominance of community-associated, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections among hospitalized children and adolescents. **Journal of medical microbiology**, v. 71, n. 3, p. 001511, 1 mar. 2022.

TURNIDGE, J.; KAHLMETER, G.; KRONVALL, G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 5, p. 418–425, 2006.

UPTON, R. N.; MOULD, D. R. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development: Part 3-introduction to pharmacodynamic modeling methods. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 3, n. 1, 2 jan. 2014.

VRBOVSKÁ, V. *et al.* Characterization of *Staphylococcus intermedius* group isolates associated with animals from antarctica and emended description of *staphylococcus delphini*. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2020.

WHO. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WU, M. T. *et al.* Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 535–542, 1 mar. 2016.

YEBRA, G. *et al.* Radical genome remodelling accompanied the emergence of a novel host-restricted bacterial pathogen. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 5, p. e1009606, 1 maio 2021.

YETMAR, Z. A. *et al.* Ceftriaxone versus antistaphylococcal antibiotics for definitive treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, p. 106486, 2022.

YU, W. et al. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. **Microbes and infection**. v. 19, p. 101-109, 2016.

ZHANG, L. et al. Pharmacodynamic Parameters of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Integration Models. **Frontiers in Veterinary Science**, n. 860472, p. 9, 24 mar. 2022.

ZHU, H. **Division of Pharmacometrics**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/division-pharmacometrics>>. Acesso em: 26 nov. 2022.

ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 735–746, 2022.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO - PK/PD INTEGRATION TO DETERMINE INTRAMUSCULAR DOSES OF SODIUM CLOXACILLIN FOR *Staphylococcus spp.* INFECTIONS IN GOAT

PK/PD integration to determine intramuscular doses of sodium cloxacillin for *Staphylococcus* spp. infections in goat

[Integração PK/PD para determinação de doses intramuscular de cloxacilina sódica para infecções causadas por *Staphylococcus* spp em caprinos]

Felix, L. A¹; Gonzaga, L. W. F. ¹; Soares, B. C. F. ¹; Veneirano, G. S.²; Brandão, H. M.³; Faccioli-Martins, P. Y.⁴; Ferrante, F.¹

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

²Universidad de la República, Montevideo, Uruguai

³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

⁴Embrapa Ovinos e Caprinos, Sobral, Ceará, Brasil

ABSTRACT

This study aims to determine therapeutic protocols of intramuscular sodium cloxacillin (SC) in goats with potential antibacterial effects against *Staphylococcus* spp. We constructed a pharmacokinetic (PK) model of SC, followed by a pharmacokinetic/pharmacodynamic integration (PK/PD). Simulations of different therapeutic protocols were then performed, with the doses ranging from 30-100 mg/kg every 8, 12, or 24 hours. We calculated the probability to target attainment (PTA) of reach protocol's therapeutic according to the minimum inhibitory concentration (MIC) range of 0.06 to 4 µg/mL. The PK/PD target (PDT) used was "time above the MIC for 40% of the time" ($T > MIC \geq 40\%$). Protocols with single administration per day were incapable of achieving $PTA \geq 90\%$ for any of the estimated MICs. However, by decreasing the administration interval, the PTA was increased. Thus, from the dose of 50 mg/kg every 12 hours, a $PTA \geq 90\%$ for MICs ≤ 0.5 µg/mL was achieved, while the 30 mg/kg dose every 8 hours was able to achieve a $PTA \geq 90\%$ for MICs of 2 µg/mL. The results suggest using a 30 mg/kg dose every 8 hours in clinical studies of agents with MICs ≤ 2 µg/mL; however, the practitioner should adjust the dose in severy patients.

Keywords: Antibioticotherapy; Monte Carlo Simulation; Pharmacometrics; Sepsis; Translational Model

RESUMO

Objetivou-se determinar protocolos terapêuticos sistêmicos de cloxacilina sódica via intramuscular em caprinos com potencial efeito antibacteriano contra *Staphylococcus* spp. Construiu-se um modelo farmacocinético (PK) de cloxacilina sódica em caprinos, a partir deste, realizou-se a integração farmacocinéticas/farmacodinâmicas (PK/PD) e simulações de diferentes protocolos terapêuticos, variando de 30-100 mg/kg com administração a cada 8, 12 ou 24 horas. Foram calculadas as probabilidades de atingir o alvo (PTA) para cada protocolo, segundo uma distribuição de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,06 a 4 µg/mL. O alvo PK/PD (PDT) utilizado foi de $T > CIM \geq 40\%$. Protocolos com uma administração por dia não foram capazes de atingir a $PTA \geq 90\%$ para nenhuma das CIMs. A diminuição do intervalo aumentou os PTAs, assim, a partir da dose de 50 mg/kg a cada 12 horas foi possível atingir

PTA $\geq$ 90% para CIMs $\leq$ 0,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto uma dose de 30 mg/kg a cada 8 horas foi capaz de atingir PTA $\geq$ 90% para uma CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados sugerem que a dose de 30 mg/kg a cada 8 horas pode ser utilizada em estudos clínicos de agentes com CIMs $\leq$ 2 $\mu\text{g/mL}$, porém, é preciso ser avaliado como os parâmetros farmacocinéticos serão alterados em pacientes críticos.

Palavras-chave: antibioticoterapia; simulação de Monte Carlo; sepse, farmacometria; modelo translacional

INTRODUCTION

Staphylococcus spp. is a common Gram-positive bacterium of the skin and mucosal microbiota; however, it is responsible for several opportunistic infections in humans and animals (Piva *et al.*, 2021). In immunosuppressed animals or a critical care state, the agent can cause skin, soft tissue, bone, and joint infections and, in systemic cases, sepsis (Tong *et al.*, 2015 e Balasubramanian *et al.*, 2017). Poorly treated sepsis can induce an inflammatory response, organ dysfunction syndrome, and shock, followed by death (Pollitt *et al.*, 2018).

In this context, cloxacillin, an isoxazolyl penicillin belonging to the beta-lactam group with action against Gram-positive bacteria and excellent activity against *Staphylococcus* spp. (methicillin-sensitive) makes itself an excellent option in both veterinary and human medicine (Burdet *et al.*, 2018; Courjon *et al.*, 2020; Aldman *et al.*, 2022). Beta-lactams have a bactericidal effect by acting on the bacterial cell wall, which decreases their toxicity. Thus, they are the antibiotics of choice for critically ill patients (Marsot, 2020).

In veterinary medicine, practitioners generally use cloxacillin intramammary to treat mastitis caused by *Staphylococcus* spp. in cows (Langoni *et al.*, 2017 e Leite *et al.*, 2020). Recently, a group studied horses' pharmacokinetics (PK) and pharmacological safety of intravenous cloxacillin-ampicillin association (Kondampati *et al.*, 2022).

Due to the increase in antimicrobial resistance, researchers have proposed several strategies to contain the emergence of new resistant strains. In 2019, the World Health Organization (WHO) released a list of the antibiotics of critical use in human medicine, which should guide the choice of antibiotic therapy used in veterinary medicine. According to this list, cloxacillin is very important, being the drug of choice in the face of other classes of antibiotics, such as 3rd-generation cephalosporins, carbapenems, quinolones, and penicillins (aminopenicillins and aminopenicillins with a beta-lactamase inhibitor), which are of maximum and high priority for human medicine (WHO, 2015).

In addition, WHO has directed the optimization of antibiotic therapy based on pharmacokinetic/pharmacodynamic integration (PK/PD) as a strategy of the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance to decrease the emergence of antimicrobial resistance (WHO, 2015; Guardabassi *et al.*, 2018; Toutain *et al.*, 2021).

This approach has already been used in veterinary medicine, as demonstrated in several studies, such as oxytetracycline dose optimization for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in calves (Lees *et al.*, 2018) and also for marbofloxacin against *Mycoplasma agalactiae* in goats (Fernández-Varón *et al.*, 2021). This approach gathers pharmacokinetic and pharmacodynamic data in an *in silico* model that predicts the plasma

concentration of a drug, followed by the simulation of different therapeutic protocols to achieve the clinical probability of success (EMA, 2016). In human medicine, researchers and doctors are using this methodology to determine the dose regimen of cloxacillin and dicloxacillin for the systemic treatment of infections against pathogens such as *Staphylococcus aureus* (Yu *et al.*, 2017 e Courjon *et al.*, 2020).

This study aims to estimate therapeutic protocols of Sodium Cloxacillin by intramuscular route in goats with potential antibacterial effect against *Staphylococcus* spp. by Monte Carlo simulation.

METHODOLOGY

We obtained cloxacillin's minimum inhibitory concentration (MIC) values against *Staphylococcus* spp. strains from previous studies published in the literature. Viridis *et al.* (2010) determined the MIC of cloxacillin against *Staphylococcus aureus* (n=25) and coagulase-negative *Staphylococcus* (n=75) strains isolated in milk from goats with subclinical mastitis, which showed MIC₉₀ of 0.5 and 1.0 µg/mL, respectively. In the study of Bolte *et al.* (2020), the isolates from goats with clinical mastitis, the MIC₉₀ for *Staphylococcus aureus* (n=85) was 1.0 µg/mL and 2.0 µg/mL for the Non-*Staphylococcus aureus* (n=88) (Tab. 1).

Microorganism	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Reference
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	1.0	Bolte <i>et al.</i> (2020)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	0.5	Viridis <i>et al.</i> (2010)
Coagulase-negative Staphylococci	0.5	1.0	Viridis <i>et al.</i> (2010)
Non- <i>aureus</i> Staphylococci	1.0	2.0	Bolte <i>et al.</i> (2020)

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration Values (MIC₅₀ and MIC₉₀) of cloxacillin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative Staphylococci and non-*aureus* Staphylococci.

The pharmacokinetic/pharmacodynamic index (PK/PD) used was the percentage of time that the plasma concentration of the drug remained above the MIC (%T>MIC). In the present study, we assumed a value of %T>MIC to be 40% of the inter-dose interval (Papich, 2014). We obtained cloxacillin's plasma concentration data from the literature. In the study of Khargharia *et al.* (2013), six goats (three males and three females) of the Black Bengal breed weighing between 12 and 14kg and aged between 1 to 1.5 years received a dose of 10mg/kg of cloxacillin intravenously. In the study of Kaleshwari *et al.* (2019), four non-lactating female sheep aged 2 to 2.5 years and 35±5kg received a 10mg/kg dose by intramuscular route.

We performed cloxacillin's pharmacokinetic modeling in Monolix 2021R2 software (Lixoft SAS, a Simulations Plus company) from the data obtained from both studies. We tested

various models with extravascular, bolus route, with or without delay, first-order or zero-order absorption, one, two, or three compartments, and linear or Michaelis-Menten elimination. The two structural models were selected based on graphical analyses of observed and predicted (Individual fits graphs) (Traynard *et al.*, 2020).

From a translational approach, we integrated the parameters of the two models to obtain pharmacokinetic parameters for a PK model of sodium cloxacillin by intramuscular route in goats. Thus, the absorption constant (K_a) obtained from the intramuscular sheep model was integrated with the volume of distribution (V_d) and clearance (Cl) parameters obtained from the intravenous goat model.

We performed the simulation in Simulx 2021R2 software (Lixoft SAS, a Simulations Plus Company). A theoretical variability (ω) was added based on models published in the literature (Supplementary Material S1). Therapeutic protocols simulations were performed with different doses ranging from 30 to 100 mg/kg, administered once, twice, or three times a day. To calculate the probability to target attainment (PTA), we performed 1000 Monte Carlo simulations of 50 subjects each (Supplementary Material S2). Then, we determined the PTA for each protocol at a MIC distribution ranging from 0.06 to 4 $\mu\text{g/mL}$. Dosing regimens with a $\text{PTA} \geq 90\%$ were potentially effective (EMA, 2016).

RESULTS

The pharmacokinetic model that best fit the data from the *in vivo* experiment was extravascular administration, no delay, first-order absorption, one-compartment distribution, and linear elimination (Fig. 1).

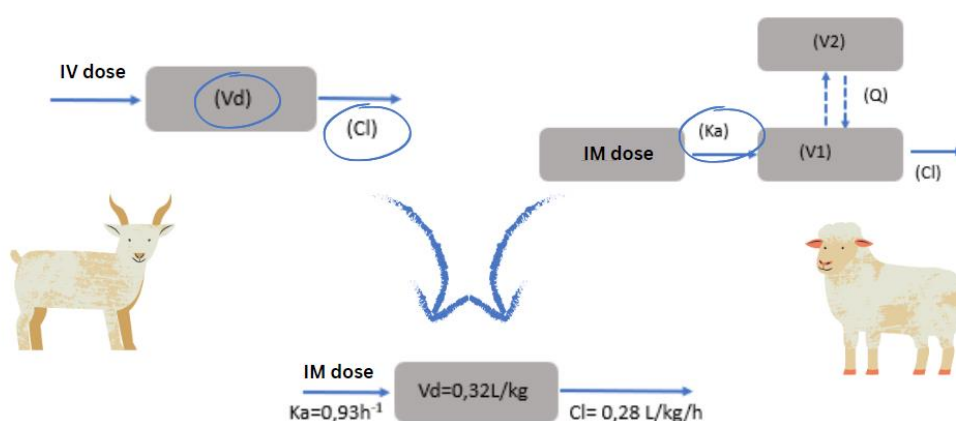


Figure 1. Schematic representation of the pharmacokinetic models of sodium cloxacillin. IV - Intravenous; V_d - Volume of distribution; Cl - Clearance; K_a - Absorption constant; V_1 - Volume of the central compartment (most vascularized organs); V_2 - Volume of the peripheral compartment; Q - Transit between compartments; IM – Intramuscular.

The pharmacokinetic parameters entered into the model for simulation of the dosing regimen were: $K_a = 0.93\text{h}^{-1}$, $V_d = 0.32\text{L/kg}$, $Cl = 0.28\text{L/kg/h}$, $\omega_{K_a} = 0.93$, $\omega_{V_d} = 1.27$ and $\omega_{Cl} = 0.95$, as well as the constant ($a=0$) and proportional error values ($b=1$).

We simulated different dose regimens and administration intervals, such as single doses of 30, 50, and 100mg/kg (Fig. 2) and 50mg/kg dose every 8, 12, and 24 hours (Supplementary Material S3).

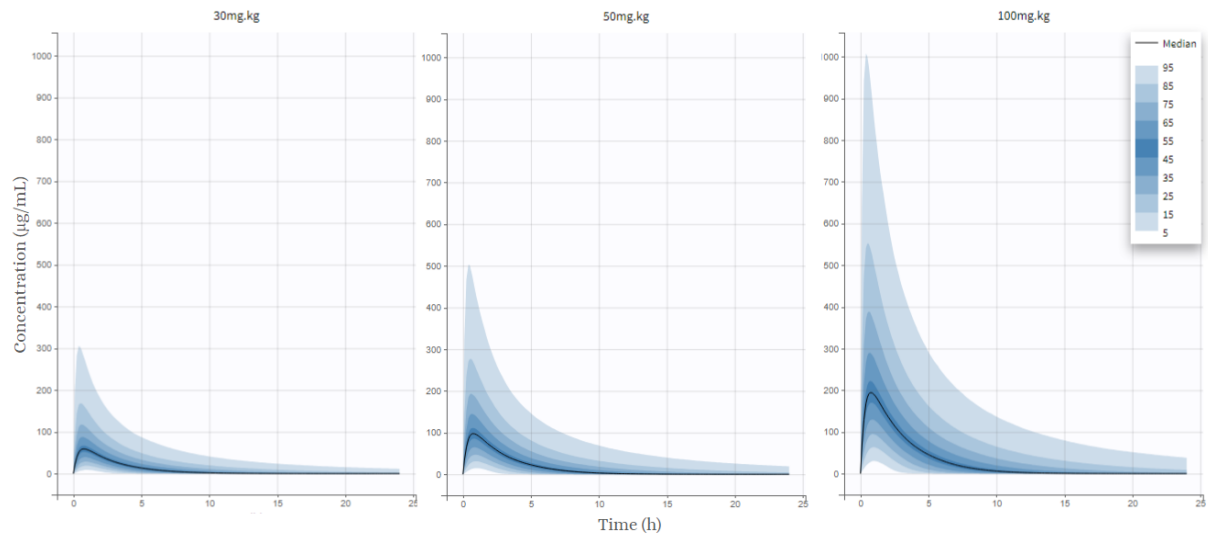


Figure 2. Simulation of therapeutic protocols of sodium cloxacillin intramuscularly in goats of 30, 50, and 100mg/kg dose every 24 hours, using a Monte Carlo simulation (n=1000).

From the PK/PD index 40%T>CIM, we estimated the PTA using a Monte Carlo simulation of six therapeutic protocols for *Staphylococcus* spp. with MIC ranging from 0.5 to 2.0µg/mL (Fig. 3 and Tab. 2).

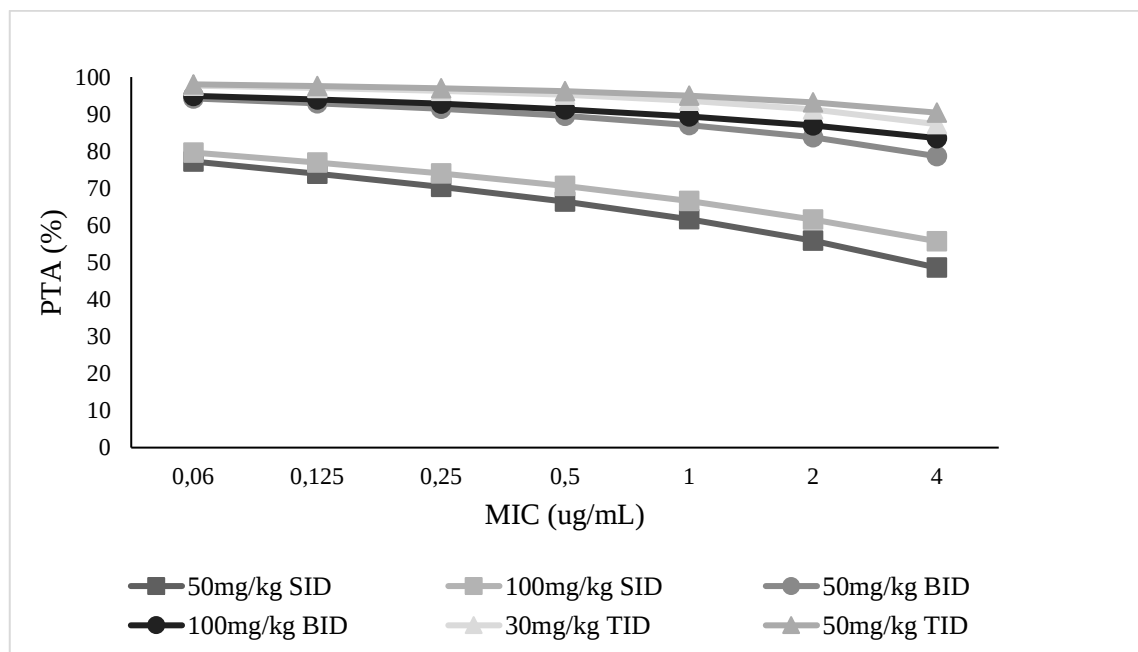


Figure 3. Probability of reaching the target for six simulated sodium cloxacillin therapeutic protocols in goats. SID - Once daily (every 24 hours); BID - twice daily (every 12 hours); TID - Three times daily (every 8 hours).

Cloxacillin daily dose	Dose per administration	Interval between administrations	PTA (%) for MIC (ug/mL)		
			0,5	1	2
3500mg	50 mg/kg	12h	90	87	84
5250mg	75 mg/kg	12h	91	88	86
7000mg	100 mg/kg	12h	91	89	87
3150mg	30 mg/kg	8h	95	94	91
5250mg	50 mg/kg	8h	96	95	93

Table 2. Probability of target attainment (PTA) for the simulated sodium cloxacillin protocols. MIC - Minimum inhibitory concentration.

DISCUSSION

The present study is the first to present an evaluation of cloxacillin protocols against *Staphylococcus* spp. in goats by intramuscular route. This dose optimization is crucial since species such as *Staphylococcus aureus* are zoonotic and responsible for nosocomial infections, with high mortality risk due to methicillin-resistant strains (Piva *et al.*, 2021). Bacteremia by *Staphylococcus* spp. is a risk in neonates during the first week of life due to failure of passive immunity, poor quality colostrum, or by umbilical infections (Abdullah *et al.*, 2015 e Garcia *et al.*, 2022).

In a microbiological study of neonatal foals, 83% of the bacteria isolated were Gram-positive, most notably *Staphylococcus* spp., which represents 24% of the isolates (Toombs-Ruane *et al.*, 2016). In addition, bacteremia and sepsis can occur from nosocomial infections due to surgical wound exposure, contaminated material, valve transplants, and orthopedic equipment (Tong *et al.*, 2015). Early treatment of bacteremia and sepsis is critical, and it is necessary to establish effective antibiotic therapies against *Staphylococcus* spp.

In this scenario, cloxacillin stands out because it has an excellent antistaphylococcal action, traditionally used in mastitis treatment, as the main genus involved is *Staphylococcus* spp. (Leite *et al.*, 2020). In human medicine, doctors mainly recommend it to treat *Staphylococcus aureus* systemic infections (Courjon *et al.*, 2020 e Aldman *et al.*, 2022;). In veterinary medicine, there are pharmacokinetic studies of sodium cloxacillin in horses (Kondampati *et al.*, 2022), goats (Khargharia *et al.*, 2013), and sheep (Kaleshwari *et al.*, 2019).

The minimum inhibitory concentration is one of the main determinants in establishing effective therapeutic protocols, especially when considering the individualized treatment of hospitalized patients or even in production systems. Thus, therapeutic protocols tend to be based on the distribution of potent MICs, as performed in the study by Yu *et al.* (2017), in which the researchers determined oral therapeutic protocols of dicloxacillin for MICs ranging from 0.016 to 8 µg/mL.

When performing a search in the literature, it became evident the lack of epidemiological studies of MIC of cloxacillin against *Staphylococcus* spp. However, there are studies with *Staphylococcus* spp. isolates, which describe the incidence, prevalence, and sensitivity profile. These studies are mainly on milk samples from mastitis in cows (Xavier *et*

al., 2017) and goats (Aragão *et al.*, 2021), as well as samples from hospital environment (Camargo *et al.*, 2021). Other researchers have engaged in phenotypic and molecular characterization of the agent (Pieri *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2021). As a consequence of methicillin resistance, one can perceive that studies with *Staphylococcus* spp. have focused on the characterization of the resistance profile, leaving aside the determination of the MIC (Campos *et al.*, 2022). Therefore, for this study, the MIC was based on studies from other countries, such as Germany (Bolte *et al.*, 2020) and Italy (Virdis *et al.*, 2010). We select data from *Staphylococcus* spp. mastitis in goats, in which the MIC₉₀ ranged from 0.5 to 2.0 µg/mL. From the Monte Carlo simulation, we calculated the PTA of different therapeutic protocols of sodium cloxacillin according to probable MICs of *Staphylococcus* spp. Figure 3 shows that the protocol with a single daily dose does not reach the PTA of 90% in any of the simulated MICs.

Based on Monte Carlo simulations, the PTA of different therapeutic protocols of cloxacillin sodium were calculated according to probable MICs. Observing Figure 3, it can be seen that the protocol with an interval between administrations every 24 hours does not reach the PTA of 90% in any of the simulated MICs. In short half-life antibiotics, such as cloxacillin, it can be hard to maintain the plasma concentration above the MIC for a large percentage of the time; however, this can be optimized by increasing the dose or decreasing the interval between administrations (Papich, 2014). Therefore, we performed regimens with shorter administration intervals (8 and 12 hours). Reducing the interval between administrations made it possible to achieve a PTA ≥90% for several MICs.

The protocols of 30 and 50 mg/kg every 8 hours showed PTA of 91% and 93%, respectively, for MIC of 2.0 µg/mL. This value was the highest among all simulated protocols. For protocols with two daily administrations (every 12 hours), increasing the dose did not increase the PTA ≥90% for the MICs of 1.0 µg/mL and 2.0 µg/mL (Tab. 2). Protocols with shorter intervals (8 hours) may not be attractive due to the difficulty of handling the animals, especially for livestock. The simulated protocols target patients in critical care with infections requiring systemic therapy, with sepsis, or at high risk of developing sepsis. Therefore, in this case, the animals are expected to be in a hospital environment.

From Table 2, it is possible to determine the best protocol for each MIC of the isolated agent, so it is at the veterinarian's discretion which therapeutic regimen to use. From the point of view of a higher PTA, the protocol of 50 mg/kg every 8 hours presents a greater chance of therapeutic success, even for bacteria with a MIC of 2 µg/mL. One can obtain similar results with a 30 mg/kg dose every 8 hours. At this dose, the PTA is within the recommended limit (PTA ≥90%), besides reducing the amount of the drug by 40% (approximately 2000 mg). For bacteria with a MIC of 0.5 µg/mL, more protocol options are available, such as the protocol of 50 mg/kg every 12 hours, which would make management easier since there are only two daily applications. Another option is the protocol of 30 mg/kg every 8 hours; despite increasing one application, the daily drug amount would be lower, therefore, better for the patient and the environment.

One must keep in mind that critically ill patients present physiological alterations, especially those related to hemodynamics, renal and hepatic function, and decreased muscle and intestinal perfusion, which result in changes in pharmacokinetics (Veiga & Paiva, 2018 e Gyssens *et al.*, 2020). In these cases, it is possible to observe an increased volume of distribution and clearance, so these patients generally have suboptimal exposure to antibiotics when used at usual doses (Abdul-Aziz *et al.*, 2020; Heffernan *et al.*, 2021). Thus, it is ideal for personalizing

therapy according to the severity of the case, such as doctors perform in human medicine (O'Jeanson *et al.*, 2021; Roggeveen *et al.*, 2022).

Thus, in cases of critically ill patients, an alternative to avoid underdose is the adoption of continuous rate infusion (CRI) in the first 24 hours to keep the cloxacillin concentration above the MIC of the infecting microorganism (Magdesian, 2017; Courjon *et al.*, 2020). In this case, it is necessary to research to determine cloxacillin CRI protocols in goats.

In the present study, the simulated protocols present a daily dose that varies from 3150 to 7000mg, similar to the study carried out by Courjon *et al.* (2020) for a new cloxacillin protocol in humans infected by *Staphylococcus aureus*, which ranged from 2000 to 12000mg/24 hours. The proposed values are consistent with the medical clinic. This form of daily drug quantification is essential to assess the degree of exposure in the animal to estimate the risk of adverse effects and the degree of toxicity, besides assessing the exposure to the surrounding environment, which is of utmost importance since the use of antimicrobials influences the ecosystem. As a result of microbiome sharing and environmental exposure, microorganisms can share resistance genes between different strains, which corroborates the emergence of new antimicrobial-resistant (Trinh *et al.*, 2018).

Beta-lactams have low toxic potential due to their mechanism of action and can be administered in higher doses, when necessary, without causing severe adverse effects. A safety study of cloxacillin demonstrated a lethal dose 50 (LD₅₀) of 1117mg/kg and 916mg/kg in mice by intramuscular and intravenous routes, respectively (Merck, 2022). The maximum intramuscular dose in adult humans indicated is 500 to 1000mg, divided between one to four daily administrations (up to 4000mg/24 hours). If necessary, the doctor can double the dose intravenously, reaching a maximum daily dose of 8000 mg/24 hours. Nevertheless, in severe cases, the maximum dosage can be adjusted and reach 12000mg/24 hours, in continuous rate infusion (CRI), as in the case of the study by Courjon *et al.* (2020).

The present study targets bacteria of the genus *Staphylococcus* spp.; however, it is worth noting that the simulated protocols can be adapted for various species of bacteria with MICs within the simulated range. Furthermore, this study shows that this methodology can be applied to determine protocols for other bacteria and antibiotics of interest in veterinary medicine.

CONCLUSION

The present study established different sodium cloxacillin protocols, which the practitioner can adjust according to the severity of infection, clinical risk, and the MIC of infecting *Staphylococcus* spp. The absence of MIC studies of cloxacillin for *Staphylococcus* spp. makes it difficult to determine the best protocol to be applied in Brazil. In addition, the study showed the need to study CRI protocols in goats. Future clinical trials are needed to evaluate cloxacillin's safety and clinical cure rates in the target species.

REFERENCES

- ABDUL-AZIZ, M. H.; ALFFENAAR, WJ-W. C.; BASSETT, M. *et al.* Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper#. *Intensive Care Medicine*, v. 46, n. 6, p. 1127–1153, 2020.
- ABDULLAH, F.; ABBA, Y.; TIJJANI, A. *et al.*, Septicemia Associated With Omphalitis in a Goat Kid. *International Journal of Livestock Research*, v. 5, n. 4, p. 113, 2015.
- ALDMAN, H. M.; KAVYANI, R.; KAHN, F.; PÅHLMAN, L. I. Treatment outcome with penicillin G or cloxacillin in penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective cohort study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 59, n. 4, p. 106567, 1 abr. 2022.
- ARAGÃO, B. B.; TRAJANO, S. C.; OLIVEIRA, R. P. *et al.* Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 79, p. 101701, 2021.
- BALASUBRAMANIAN, D.; HARPER, L.; SHOPSIN, B.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathogens and Disease*, v. 75, n. 1, p. ftx005, 2017.
- BOLTE, J.; ZHANG, Y.; WENTE, N.; KRÖMKER, V. *In vitro* susceptibility of mastitis pathogens isolated from clinical mastitis cases on northern german dairy farms. *Veterinary Sciences*, v. 7, n. 1, 2020.
- BURDET, C.; LOUBET, P.; MOING, V. L. *et al.* Efficacy of cloxacillin versus cefazolin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia (CloCeBa): study protocol for a randomised, controlled, non-inferiority trial. *BMJ Open*, v. 8, p. 23151, 2018.
- CAMARGO, C. H.; CUNHA, M. L. R. S.; COSTA, J. *et al.* Incidence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis-associated peritonitis in a single center using molecular methods. *International Urology and Nephrology*, v. 53, p. 373–380, 2021.
- CAMPOS, B.; PICKERING, A. C.; ROCHA, L. S. *et al.* Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, 2022.
- COURJON, J.; GARZARO, M.; ROGE, A-M *et al.* A Population Pharmacokinetic Analysis of Continuous Infusion of Cloxacillin during *Staphylococcus aureus* Bone and Joint Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 64, n. 12, 2020.
- EMA. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CHMP/594085/2015). *EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*, p. 17, 2016.
- FERNÁNDEZ-VARÓN, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; SERRANO-RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* PK/PD analysis of marbofloxacin by monte carlo simulation against *Mycoplasma agalactiae* in

plasma and milk of lactating goats after IV, SC and SC-long acting formulations administration. *Animals*, v. 11, p. 1104, 2021.

GARCIA, J.; PEMPEK, J.; HENGY, M. *et al.* Prevalence and predictors of bacteremia in dairy calves with diarrhea. *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 1, p. 807–817, 2022.

GUARDABASSI, L.; APLEY, M.; OLSEN, J. E. *et al.* Optimization of Antimicrobial Treatment to Minimize Resistance Selection. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 3, 2018.

GYSENS, I. C.; D'ONOFRIO, V.; MEERSMAN, A. *et al.* Risk Factors for Mortality, Intensive Care Unit Admission, and Bacteremia in Patients Suspected of Sepsis at the Emergency Department: A Prospective Cohort Study. *Open Forum Infectious Diseases*, p. 6, 2020.

HEFFERNAN, A. J.; MOHD, S.; LIM, S. *et al.* A personalised approach to antibiotic pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, v. 40, n. 100970, p. 14, 2021.

KALESHWARI, L.; AHMAD, A. H.; PANT, D. *et al.* Pharmacokinetics of amoxicillin and cloxacillin following single dose intravenous and intramuscular administration in sheep. *Haryana Veterinarian*, v. 58, n. 2, p. 185–189, 2019.

KHARGHARIA, S.; CHAKRABORTY, A. K.; BHATTACHARYYA, A. *et al.* Disposition Kinetic of Cloxacillin in Healthy and Nephropathic Goats with Immunological and Residual Level in Blood and Tissues. *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, n. 1, p. 24–30, 2013.

KONDAMPATI, K. D.; SAINI, S. P. S.; SIDHU, P. K. *et al.* Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of Ampicillin-Cloxacillin Combination in Indian Thoroughbred Horses (*Equus caballus*) and Safety Evaluation of the Computed Dosage Regimen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 115, p. 104020, 2022.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

LEES, P.; POTTER, T.; PELLIGAND, L.; TOUTAIN, P. L. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of oxytetracycline for the calf pathogens *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 41, n. 1, p. 28–38, 2018.

LEITE, J. A. B.; ARAÚJO, R. M. P.; PEIXOTO, R. M. *et al.* Efficacy of three methods used to control staphylococcal mastitis in dairy goats. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 41, n. 6, p. 2825–2831, 2020.

MAGDESIAN, K. G. Antimicrobial Pharmacology for the Neonatal Foal. *Veterinary Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 47–65, 2017.

MARSOT, A. Review of population pharmacokinetic models of first choice beta-lactam antibiotics in severely afflicted pediatric patients: Discrepancy in dosage regimens. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 23, p. 470–485, 2020.

MERCK. Cloxacillin Formulation - Safety Data Sheet. New Jersey. 2022.

O'JEANSON, A.; LARCHER, R.; SOUDER, C. LE. *et al.* Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Meropenem in Critically Ill Patients: How to Achieve Best Dosage Regimen According to the Clinical Situation. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 46, n. 5, p. 695–705, 2021.

PAPICH, M. G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 480–486, 2014.

PIERI, F. A.; VARGAS, T. F.; GALVÃO, N. N. *et al.* Phenotypic and molecular aspects of *Staphylococcus* spp. Isolated from hospitalized patients and beef in the Brazilian Amazon. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 13, n. 3, p. 128–134, 2016.

PIVA, S.; MARIELLA, J; CRICCA, M. *et al.* Epidemiologic case investigation on the zoonotic transmission of *Staphylococcus aureus* infection from goat to veterinarians. *Zoonoses and Public Health*, v. 68, n. 6, p. 684–690, 2021.

POLLITT, E. J. G.; SZKUTA, P. T.; BURNS, N.; FOSTER, S. J. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 6, p. e1007112, 2018.

ROGGEVEEN, L. F.; GUO, T.; Fleuren, L. M. *et al.* Right dose, right now: bedside, real-time, data-driven, and personalised antibiotic dosing in critically ill patients with sepsis or septic shock-a two-centre randomised clinical trial. *Critical care (London, England)*, v. 26, n. 1, 2022.

TEIXEIRA, N. B.; FORTALEZA, C. M. C; SOUZA, M. C.; *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among insulin-dependent diabetic individuals in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2021.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TOOMBS-RUANE, L. J.; RILEY, C. B.; KENDALL, A. T. *et al.* Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from neonatal foal samples submitted to a New Zealand veterinary pathology laboratory (2004 to 2013). *New Zealand Veterinary Journal*, v. 64, n. 2, p. 107–111, 2016.

TOUTAIN, P. L.; PELLIGAND, L.; LEES, P. *et al.* The pharmacokinetic/pharmacodynamic paradigm for antimicrobial drugs in veterinary medicine: Recent advances and critical appraisal. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 2, p. 172–200, 2021.

TRAYNARD, P.; AYRAL, G.; TWAROGOWSKA, M.; CHAUVIN, J. Efficient Pharmacokinetic Modeling Workflow With the MonolixSuite: A Case Study of Remifentanyl. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, v. 9, n. 4, p. 198–210, 2020.

TRINH, P.; ZANEVELD, J. R.; SAFRANEK, S.; RABINOWITZ, P. M. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. *Frontiers in Public Health*, v. 6, 30 ago. 2018.

VEIGA, R. P.; PAIVA, J. A. Pharmacokinetics–pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients. *Critical Care*, v. 22, n. 1, p. 1–34, 24 set. 2018.

VIRDIS, S.; SCARANO, C.; COSSU, F. *et al.* Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. *Research Veterinary Medicine International*, v. 2010, p. 6, 2010.

WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization, 2015.

XAVIER, A. R. E. O.; ALMEIDA, A. C.; SOUZA, C. N. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 2, p. 16029709, 2017.

YU, W.; JI, J.; XIAO, T. *et al.* Determining optimal dosing regimen of oral administration of dicloxacillin using monte carlo simulation. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 1951–1956, 2017.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1. Model code for simulation of cloxacillin therapeutic protocols by intramuscular route in goats.

```

1  [INDIVIDUAL]
2  input = {ka_pop, omega_ka, V_pop, omega_V, Cl_pop, omega_Cl}
3
4  DEFINITION:
5  ka = {distribution=logNormal, typical=ka_pop, sd=omega_ka}
6  V = {distribution=logNormal, typical=V_pop, sd=omega_V}
7  Cl = {distribution=logNormal, typical=Cl_pop, sd=omega_Cl}
8
9  [LONGITUDINAL]
10 input = {a, b}
11 ;;;; Included file 'oral1_lcpt_kaVCl.txt'
12
13 DESCRIPTION:
14 The administration is extravascular with a first order absorption (rate constant ka).
15 The PK model has one compartment (volume V) and a linear elimination (clearance Cl).
16 input = {ka, V, Cl}
17
18 PK:
19 ; PK model definition
20 Cc = pkmodel(ka, V, Cl)
21
22 OUTPUT:
23 output = Cc
24 ;;;;

```

S2. Model code for simulation of the Probability of Reaching the Target (PTA) considering a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 4µg/ml.

```

30 EQUATION:
31 MIC=4
32
33 TimeAboveMIC_0 = 0
34
35 if Cc > MIC
36
37     xTime = 1
38
39 else
40
41     xTime = 0
42
43 end
44
45 ddt_TimeAboveMIC = xTime
46
47 PercentTimeAboveMIC = 100*TimeAboveMIC/t
48

```

S3. Simulation of therapeutic protocols of sodium cloxacillin in goats at 50 mg/kg dose every 24, 12, and 8 hours.

