

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE  
Ciclo XXXI

Settore concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore scientifico disciplinare: VET/07

USO RESPONSABILE DEI FLUOROCHINOLONI:  
OTTIMIZZAZIONE DELL'APPROCCIO  
TERAPEUTICO DI MARBOFLOXACINA  
NEL SUINO

Presentato da: Dott.ssa Eva Morbidelli

Coordinatore Dottorato

Chia.mo Prof. Arcangelo Gentile

Relatore

Gent.ma Prof.ssa Anna Zaghini

Esame finale anno 2019

*A mio figlio Carlo*

*Qualunque cosa tu possa fare o sognare di fare, incominciala!*

*L'audacia ha in sé genio, potere e magia.*

*(Goethe)*

# INDICE

	pag.
<i>Frontespizio</i> .....	1
<i>Indice</i> .....	3
<i>Lista delle abbreviazioni</i> .....	5
<i>Sommario</i> .....	6
Capitolo 1      INFORMAZIONI GENERALI .....	8
1.1.      Fluorochinoloni.....	9
1.1.1.      Meccanismo d'azione.....	11
1.1.2.      Resistenza antimicrobica.....	13
1.1.3.      Raccomandazioni per la prevenzione della resistenza.....	16
1.2.      Marbofloxacin .....	23
1.2.1.      Caratteristiche della molecola .....	23
1.2.2.      Meccanismo d'azione .....	25
1.2.3.      Efficacia antimicrobica.....	25
1.2.4.      Tossicità.....	26
1.3.      Principali patogeni respiratori del suino sensibili a marbofloxacin..	29
1.3.1. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	29
1.3.2. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	40
1.3.3. <i>Pasteurella multocida</i> .....	48
1.4.      Effetto post antibiotico e correlazione PK/PD.....	58
Capitolo 2      SCOPO DELLA RICERCA.....	63
Capitolo 3      STUDI SPERIMENTALI.....	65
3.1.      Profilo farmacologico .....	66
3.1.1.      Farmacocinetica .....	66

3.1.2.	Farmacodinamica .....	72
3.1.3.	Correlazione PK/PD.....	77
3.2.	Efficacia clinica .....	82
3.2.1.	Studio clinico.....	82
3.3.	Profilo di Sicurezza.....	88
3.3.1.	Studio di Cinetica residuale.....	88
3.3.2.	Tollerabilità nella specie di destinazione.....	95
3.3.3.	Ecotossicità.....	99
CONCLUSIONI.....		105

## *Lista delle abbreviazioni*

ANOVA	Analisi della varianza
AUC	Area sotto la curva
CEESA	Executive Animal Health Study Center
C <sub>MAX</sub>	Concentrazione massima
CPS	Polisaccaridi Capsulari
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
DNA	Acido Desossiribonucleico
DS	Deviazione Standard
EM(E)A	European Medicines Agency
EOG	Esame Obbiettivo Generale
EOP	Esame Obbiettivo Particolare
ESVAC	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
EU	Unione Europea
FLQ	Fluoroquinoloni
GCP	Good Clinical Practice
GLP	Good Laboratory Practice
LPS	Lipopolisaccaridi
MBC	Minima concentrazione battericida
MIC	Minima concentrazione inibitoria
NAD	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
OIE	Organizzazione mondiale della sanità
p.v.	Peso Vivo
PAE	Effetto post antibiotico
PALE	Aumento post antimicrobico dei leucociti
PCP	Pleuropolmonite Contagiosa del Suino
PCR	Polymerase chain reaction
PCU	Population Correction Unit
PD	Farmacodinamica
PEC	Predicted Environmental Concentration
PK	Farmacocinetica
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex
RCP	Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto
RNA	Acido Ribonucleico
SRD	Sindrome respiratoria suina
T <sub>MAX</sub>	Tempo di massima concentrazione
VF	Fattore di virulenza
WHO	World Health Organization

## Sommario

I fluorochinoloni (FLQ) sono tra gli antibiotici di più frequente impiego in Medicina Veterinaria per il trattamento di patologie respiratorie ed enteriche sia in animali produttori di derrate alimentari per l'uomo che in animali da compagnia.

Marbofloxacin è il fluorochinolone esclusivo per il settore veterinario che negli ultimi 10 anni ha avuto un largo impiego nel trattamento delle infezioni respiratorie del suino, alla posologia intramuscolare di 2 mg/kg di p.v. per 3-5 giorni.

Alla luce della sempre maggiore attenzione all'uso prudente e responsabile degli antibiotici (i FLQ sono inseriti da WHO tra gli antibiotici di importanza critica per l'uomo e dall'OIE per gli animali) e per venire incontro alle richieste di contenimento delle resistenze, si è voluto studiare un nuovo approccio terapeutico che risultasse efficace, sicuro e attento anche a questo aspetto.

Sulla base di una valutazione aggiornata delle MIC riferite ai principali patogeni respiratori del suino (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*), per confermarne la sensibilità alla marbofloxacin, sono stati condotti studi sperimentali in conformità alle normative Italiane ed Europee, alle GLP e GCP, che prevedono la somministrazione intramuscolare one-shot di dosaggi maggiori di principio attivo.

I risultati di PK/PD incrociati hanno individuato nella dose one-shot intramuscolo di 8 mg/kg p.v. la posologia più idonea per un approfondimento sperimentale di tipo clinico.

I risultati ottenuti dagli studi clinici condotti nel suino hanno confermato che la dose unica di 8 mg di marbofloxacin/kg p.v. oltre a risultare efficace per la terapia di infezioni respiratorie del suino causate da ceppi sensibili di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*, è sicura per l'uomo, l'animale e per l'ambiente.

Nell'ottica dell'antibiotico resistenza, il margine di sicurezza e l'efficacia dimostrati al dosaggio prescelto, confermano come l'approccio one-shot sia da preferirsi rispetto ad una posologia più bassa e ripetuta.

## Abstract

Fluoroquinolones (FLQ) are among the most widely used antibiotics in Veterinary Medicine for the treatment of respiratory and enteric diseases in food-producing animals and in pets.

Marbofloxacin is the fluoroquinolone exclusive for veterinary medicine that in the last 10 years has been widely used for the treatment of respiratory infections in pig at the intramuscular dose of 2 mg/kg b.w for 3-5 days.

In the light of the increasing attention to the prudent and responsible use of antibiotics (FLQs are inserted by WHO among the antibiotics of critical importance for humans and by OIE for animals) and to meet the requests to contain the resistances, a new therapeutic approach that would be effective, safe and also careful at this aspect was studied.

On the basis of an updated assessment of the MICs referring to the main respiratory pathogens in pigs (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*), experimental studies administering higher dosages of active ingredient in a single intramuscular one-shot dose to confirm the sensitivity to marbofloxacin have been carried out. The studies were conducted according to the Italian and European regulations, and both GLP and GCP.

The results of the PK/PD evaluation identified in the intramuscular one-shot dose of 8 mg/kg b.w. the most suitable dosage for an clinical in-depth investigation.

The results of clinical studies I pigs confirmed that the one-shot dose of 8 mg marbofloxacin/kg b.w. administered intramuscularly is clinically efficacious against the respiratory diseases of the pig caused by sensitive strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* and it is safe for humans, animals and environment.

In order to prevent the antibiotic resistance, the safety margin and efficacy demonstrated at the chosen dosage confirm that the one-shot approach has to be preferred respect to a lower and repeated dosage

*Capitolo 1*

# *Informazioni Generali*



## 1.1. FLUROCHINOLONI

I Fluorochinoloni sono stati scoperti negli anni '60 come derivati della cloroquina antimalarica. Il primo farmaco di questa classe è l'acido nalidixico, approvato per uso clinico nel 1965. L'acido nalidixico è scarsamente assorbito nel tratto gastrointestinale e ha uno spettro ristretto di attività. Il suo uso è limitato al trattamento delle infezioni del tratto urinario causate da *Enterobacteriaceae spp.*. La struttura dell'acido nalidixico è stata modificata nel 1985, migliorandone assorbimento e biodisponibilità e ampliandone lo spettro d'azione includendo anche *Pseudomonas aeruginosa*. In Tabella 1 sono riportati i principali FLQ utilizzati nel mondo nelle varie specie animali.

Negli ultimi 40 anni, innumerevoli sono i FLQ che sono stati sviluppati per l'uso nella medicina sia umana che veterinaria. I primi FLQ approvati per l'uso nella clinica sono stati norfloxacin e ciprofloxacina nel 1985. Nel 1989, l'enrofloxacin è stato il primo FLQ approvato per l'uso in cani e gatti, seguito da orbifloxacin (1997), difloxacin (1997, solo per cani) e marbofloxacina (1999, approvato per gatti).

Tabella 1 - Impiego dei fluorochinoloni nel mondo in animali produttori di derrate alimentari e da compagnia (WHO/EMC/ZDI/98.10, 1998).

Region	Livestock	Poultry	Pet animals	Fish
Europe	enrofloxacin, flumequine, marbofloxacina, danofloxacin	enrofloxacin, difloxacin, flumequine, oxolinic acid	enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacina	sarafloxacin, (oxolinic acid) <sup>a</sup>
USA	none	enrofloxacin, sarafloxacin	enrofloxacin, difloxacin, orbifloxacin	none
Japan	enrofloxacin, danofloxacin, orbifloxacin, difloxacin, oxolinic acid	enrofloxacin, danofloxacin, ofloxacin, vebufloxacin, oxolinic acid	enrofloxacin, orbifloxacin	oxolinic acid
Asia	enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacina	enrofloxacin, ciprofloxacina, danofloxacin, ofloxacin, flumequine, norfloxacin, oxolinic acid, (sarafloxacin)	enrofloxacin	oxolinic acid, enrofloxacin, flumequine
Latin America	enrofloxacin, ciprofloxacina, danofloxacin, norfloxacin, (flumequine)	enrofloxacin, ciprofloxacina, danofloxacin, norfloxacin, (flumequine, oxolinic acid)	enrofloxacin	oxolinic acid
Canada		enrofloxacin <sup>b</sup>	enrofloxacin	
Australia	none	none	enrofloxacin	none
South Africa	enrofloxacin, danofloxacin	enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin	enrofloxacin	

<sup>a</sup> Substances in parentheses are in limited use.  
<sup>b</sup> Voluntarily withdrawn from the market in 1998.

## Capitolo 1 Informazioni Generali

La pradofloxacin è un fluorochinolone di recente scoperta che sembra avere una maggiore attività battericida. La ciprofloxacina, sebbene non approvata per l'uso in medicina veterinaria, viene frequentemente utilizzata off-label in cani e gatti (Pallo-Zimmerman et al., 2010).

In Tabella 2 sono riassunti gli impieghi dei FLQ in medicina veterinaria.

Tabella 2 - Impiego dei fluorochinoloni per il trattamento delle principali patologie negli animali (WHO/EMC/ZDI/98.10, 1998).

Animal species	Licensed use	Major bacteria	Formulations
cattle	respiratory, enteric	<i>Pasteurella</i> spp., <i>Haemophilus somnus</i> , <i>Mycoplasma bovis</i>	injectable, bolus
swine	respiratory, enteric, mastitis/metritis	<i>Pasteurella</i> spp., <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>E. coli</i>	injectable, oral solution, feed medication
broilers	respiratory, enteric	<i>E. coli</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Salmonella</i>	oral (water medication)
turkeys	respiratory, enteric	<i>E. coli</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Salmonella</i>	oral (water medication)
fish	generalised conditions (septicemia), skin/ulcers	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio</i> spp.	oral (feed medication), water bath
dogs	skins/wounds, urinary tract, respiratory	<i>S. intermedius</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella</i>	tablets, injectable
cats	skins/wounds, urinary tract, respiratory	<i>S. intermedius</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella</i>	tablets, injectable

### 1.1.1. Meccanismo d'azione

I fluorochinoloni agiscono inibendo i due enzimi coinvolti nella sintesi del DNA batterico, le topoisomerasi del DNA batterico (DNA girasi e topoisomerasi IV). La selettività di questa classe antimicrobica per le topoisomerasi delle cellule procariote consente a queste molecole di essere specifiche e battericide. Le DNA topoisomerasi sono responsabili della separazione dei filamenti del DNA batterico, inserendo un altro filamento di DNA attraverso la rottura e quindi richiudendo i filamenti originariamente separati (Blondeau, 2004).

In particolare, i fluorochinoloni interagiscono con il complesso del DNA legato all'enzima (cioè DNA girasi con DNA batterico o topoisomerasi IV con DNA batterico) per creare cambiamenti conformazionali che determinano l'inibizione della normale attività enzimatica. Di conseguenza, il nuovo complesso farmaco-enzima-DNA blocca la progressione della forcella di replicazione, inibendo in tal modo la normale sintesi del DNA batterico con conseguente rapida morte delle cellule batteriche (Blondeau, 2004).

Altri Autori (Andraud et al., 2011) hanno identificato, oltre al meccanismo basato sull'inibizione della replicazione del DNA attraverso l'interazione con DNA girasi e topoisomerasi IV, altri due meccanismi di azione dei fluorochinoloni non del tutto descritti. L'attività battericida che deriva da questi molteplici meccanismi potrebbe spiegare l'alta efficacia dei fluorochinoloni rispetto ad altri antimicrobici.

I fluorochinoloni più vecchi presentano uno schema relativamente costante rispetto alla specificità dell'inibizione enzimatica in diversi tipi di batteri. Sebbene possa esistere un certo grado di sovrapposizione, la DNA girasi tende ad essere l'obiettivo primario dei fluorochinoloni negli organismi Gram-negativi, mentre la topoisomerasi IV è tipicamente l'obiettivo primario nei batteri Gram-positivi. Questa specificità ha importanti implicazioni nello sviluppo della resistenza ai fluorochinoloni più vecchi e nell'efficacia di nuovi fluorochinoloni contro i ceppi resistenti.

I dati di studi su specie mutanti resistenti suggeriscono che i fluorochinoloni di ultima generazione possiedono probabilmente un meccanismo d'azione doppio, inibendo sia la DNA girasi che la topoisomerasi IV, nelle specie Gram-positive. Sebbene alcuni abbiano discusso della dualità di nuovi fluorochinoloni basati su studi enzimatici e genetici,

il consenso generale è che alcuni agenti più recenti, come la gatifloxacina e la moxifloxacina, possiedono una doppia attività.

A causa della rarità delle doppie mutazioni (ad esempio  $10^{-14}$  per i fluorochinoloni in *Streptococcus pneumoniae*), l'uso preferenziale di tali agenti potrebbe potenzialmente limitare l'insorgenza della resistenza ai fluorochinoloni (Blondeau, 2004).

### 1.1.2. Resistenza antimicrobica

La resistenza ai fluorochinoloni in generale è oggi uno dei principali argomenti di discussione in sede internazionale tanto che è stato oggetto di rapporti EMA (2006, 2009 e 2017) per l'uso prudente di queste sostanze antibiotiche in medicina veterinaria.

Il meccanismo di resistenza ai fluorochinoloni si basa su molti fattori: il cambiamento dei siti target, la protezione dei bersagli, la minore espressione del bersaglio, il potenziamento delle pompe di efflusso e l'inattivazione dei fluorochinoloni stessi. Questi meccanismi possono essere mediati da cromosomi o plasmidi (Tabella 3).

Tabella 3 - Possibili meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni.

Resistenza cromosomica	Resistenza mediata da plasmidi
Mutazione del bersaglio	Minore espressione del bersaglio
Minore espressione del bersaglio	Protezione del bersaglio
Protezione del bersaglio	Potenziamento delle pompe di efflusso
Potenziamento delle pompe di efflusso	Inattivazione dei fluorochinoloni

Infatti, man mano che venivano scoperti nuovi chinoloni, si identificavano sempre più complessi meccanismi responsabili della resistenza (Sanders, 2001). Al giorno d'oggi, è noto che la resistenza antimicrobica ai chinoloni è mediata da tre principali meccanismi (Jacoby, 2005):

a) un meccanismo correlato alla mutazione di uno o di entrambi gli enzimi bersaglio dei batteri (DNA girasi un tipo di topoisomerasi II e DNA topoisomerasi IV) che diminuisce la capacità di legame al complesso enzima-DNA. Entrambi sono enzimi grandi e complessi composti da due coppie di subunità: GyrA e GyrB (codificate rispettivamente da geni *gyrA* e *gyrB*) per DNA-girasi e ParC e ParE (codificati rispettivamente da geni *parC* e *parE*) per DNA topoisomerasi IV. La resistenza comporta le sostituzioni di aminoacidi in una regione delle subunità GyrA e ParC denominate "regioni che determinano la resistenza dei chinoloni" (QRDR "quinolone resistance-determining regions");

b) un meccanismo responsabile dell'aumento dell'attività delle pompe di efflusso mediata da mutazioni a repressori trascrizionali o che causano una nuova espressione di trasportatori di farmaci che portano a una riduzione del farmaco accumulato. I meccanismi

di alterazioni del bersaglio e di attivazione dell'efflusso sono stati trovati spesso insieme negli isolati clinici resistenti;

c) un meccanismo di resistenza più recentemente descritto mediato da plasmidi (Tran e Jacoby, 2002). I geni della resistenza ai chinoloni mediata da plasmide (PMQR) sono stati denominati *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS* ciascuno con molte varianti e *qnrC* e *qnrD*, che aumentano la resistenza sia all'acido nalidixico che ai fluorochinoloni). Le proteine Qnr legano e proteggono i bersagli dall'inibizione dei chinoloni (DNA-girasi e DNA topoisomerasi IV) (Trouchon e Lefebvre, 2016). Sebbene questi determinanti PMQR conferiscano un basso livello di resistenza ai chinoloni e/o ai fluorochinoloni, essi rappresentano un punto di partenza favorevole alla selezione di ulteriori meccanismi di resistenza ai chinoloni mediata da cromosomi (Poirel et al., 2005).

L'evoluzione della resistenza ai chinoloni si manifesta in modo graduale attraverso l'accumulo di mutazioni spontanee nei geni cromosomici, modulati dalla resistenza mediata dal plasmide. Quindi, il potenziamento di più pompe di efflusso è responsabile della diminuzione della suscettibilità ai fluorochinoloni in mutanti in cui sono state precedentemente formate mutazioni nel gene *gyrA* (Usui et al., 2011). Alcuni Autori ritengono che ciascuna mutazione spontanea diminuisca la suscettibilità dei chinoloni da 4 a 8 volte e che singole mutazioni possano essere accumulate attraverso le generazioni successive per produrre mutanti di terzo, quarto e quinto livello, e così via. La mutazione che si verifica in ogni fase del percorso varia notevolmente, a seconda dell'organismo coinvolto e del chinolone utilizzato per selezionare ciascun mutante (Sanders, 2001).

Pertanto, diversi meccanismi o combinazioni di uno stesso meccanismo possono spiegare la presenza di resistenze crociate o resistenze antimicrobiche multiple (Garau, 2000; Sanders, 2001). In ceppi di *E. coli* multiresistenti, è stato dimostrato che un meccanismo di resistenza combinato cromosomico (a e b) e plasmidico (c) può fornire a una resistenza combinata ai fluoroquinoloni (Gibson et al., 2010 a, b).

Inoltre, è stato riportato che in alcune specie batteriche i geni PMQR sono co-localizzati con  $\beta$ -lattamasi e altri geni di resistenza su grandi plasmidi trasferibili. Quindi, potrebbero svilupparsi fenomeni di co-resistenza a classi di antimicrobici che appartengono a gruppi farmacologici diversi (Gibson et al., 2010b).

D'altra parte, il confronto tra il profilo di espressione delle pompe di efflusso e l'idrofobicità dei farmaci, potrebbe determinare una resistenza variabile per diversi fluorochinoloni (Huguet et al., 2013) e potrebbe spiegare la bassa insorgenza di resistenza crociata tra diversi fluorochinoloni e il fenomeno di resistenza dicotomica ai fluorochinolone precedentemente descritta (Vanni et al., 2012).

Quindi, man mano che migliora la comprensione dello sviluppo di resistenze e vengono chiariti i meccanismi responsabili della resistenza crociata e dicotomica, dovrebbe essere possibile prevedere quali chinoloni hanno meno probabilità di sviluppare resistenza (Sanders, 2001).



1.1.3. Raccomandazioni per la prevenzione della resistenza

La classe dei FLQ è largamente utilizzata, in tutto il mondo, sia in animali produttori di derrate alimentari sia in animali da compagnia, in formulazioni orali e iniettabili.

I recenti dati di vendite dei FLQ in Europa (Figura 1) presentati nell'ultimo report ESVAC (EMA, 2017) confermano che alcuni Paesi EU fanno maggior consumo di FLQ associato spesso all'impiego di formulazioni orali (Figura 2) mentre nei Paesi in cui il consumo di FLQ è minore sono impiegate maggiormente formulazioni iniettabili.

Figura 1 - Dati di vendita di FLQ (mg/PCU) a uso veterinario nei diversi Paesi Europei (dati EMA/ESVAC 2017).

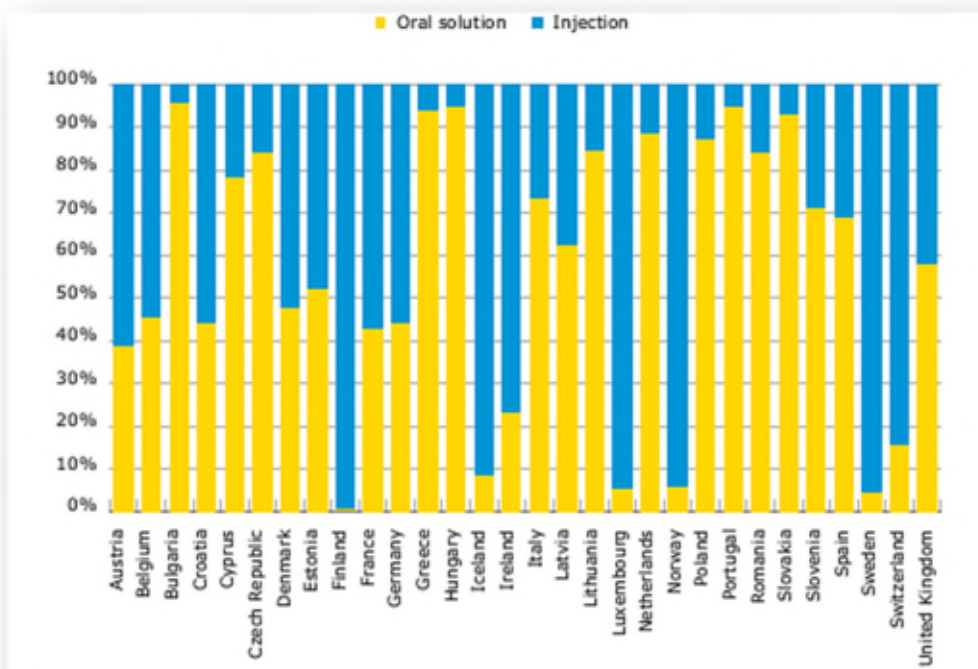


Figura 2 - Distribuzione di vendita delle formulazioni farmaceutiche e veterinarie contenenti FLQ (mg/PCU) nei diversi Paesi Europei (dati EMA/ESVAC 2017).



## Capitolo 1 Informazioni Generali

A livello EU, il suino è la categoria produttiva in cui si ha il maggior impiego di FLQ (Tabella 4), considerando l'indice PCU (Population Correction Unit) che si ottiene moltiplicando il numero di animali allevati e macellati per il loro peso vivo stimato al momento del trattamento farmacologico.

Tabella 4 – Stima dei PCU della popolazione di animali produttori di derrate alimentari nelle varie regioni europee 2015 (EMA - ESVAC 2017).

Country	Cattle	Pigs	Poultry	Sheep/ goats	Fish	Rabbits	Horses	Total
Austria	438	374	79	34	0	0	32	957
Belgium	457	905	221	16	0	4	115	1,719
Bulgaria	129	73	46	96	0	0	35	380
Croatia	112	81	36	45	0	0	0	274
Cyprus	18	46	13	30	0	0	2	108
Czech Republic	295	202	122	18	20	7	34	698
Denmark	389	1,784	116	12	44	0	70	2,415
Estonia	64	45	3	7	1	0	4	123
Finland	227	165	70	13	15	0	30	519
France	3,214	1,817	1,169	632	45	51	219	7,147
Germany	3,167	3,901	1,067	138	27	34	356	8,690
Greece	104	130	116	799	106	0	13	1,268
Hungary	157	333	191	100	20	7	24	833
Iceland	18	6	5	48	8	0	30	116
Ireland	1,137	276	79	300	40	0	60	1,892
Italy	1,569	828	730	573	177	30	130	4,038
Latvia	110	40	19	8	0	0	4	180
Lithuania	197	72	51	11	0	0	7	339
Luxembourg	40	11	0	0	0	0	2	53
Netherlands	1,055	1,661	404	88	62	1	47	3,318
Norway	214	126	65	104	1,388	0	14	1,912
Poland	1,521	1,412	1,118	18	0	2	121	4,193
Portugal	229	344	214	174	11	7	18	997
Romania	614	337	423	998	4	0	183	2,559
Slovakia	96	61	53	31	1	0	4	246
Slovenia	96	19	38	8	2	0	10	173
Spain	941	3,660	793	1,477	335	73	253	7,532
Sweden	305	200	97	50	11	0	145	808
Switzerland	485	208	68	32	0	1	22	815
United Kingdom	1,743	770	1,082	2,796	193	0	378	6,961
<b>Total 30 countries</b>	<b>19,141</b>	<b>19,887</b>	<b>8,491</b>	<b>8,656</b>	<b>2,511</b>	<b>216</b>	<b>2,364</b>	<b>61,266</b>

In considerazione del largo impiego che si è fatto di questi farmaci, da alcuni anni i FLQ sono oggetto di raccomandazioni e limitazioni di uso a livello Europeo e mondiale, a causa del ruolo importante che essi hanno nel possibile sviluppo di resistenze antimicrobiche da parte di numerosi patogeni umani.

Nel 1998 la WHO (World Health Organization) ha redatto un report in cui viene analizzato in modo dettagliato l'uso dei chinoloni in medicina veterinaria e il potenziale rischio per la salute umana. Il problema principale deriva dall'utilizzo di antimicrobici a largo spettro d'azione e a posologie sub-terapeutiche nelle infezioni umane, incluse le patologie gastroenteriche causate da batteri zoonotici trasmessi all'uomo attraverso la catena alimentare.

Alla luce di quanto emerso, le maggiori Organizzazioni per la salvaguardia della salute umana e animale hanno redatto linee guida apposite per l'utilizzo dei FLQ.

L'EMA nel gennaio 2006 ha adottato un Reflection Paper sull'uso dei FLQ in animali produttori di derrate alimentari nel quale si analizzano gli effetti di questi farmaci nell'EU relativamente allo sviluppo di possibili resistenze nelle specie batteriche che sono importanti per la salute umana e animale. Sulla base delle considerazioni e delle conclusioni scientifiche, il CVMP ha elaborato negli ultimi anni una serie di azioni per minimizzare il rischio di insorgenza di resistenza (EMA 2006, 2009 e 2010), adottate poi da tutti gli Stati Membri dell'EU tra cui l'Italia (GISIO, 2017). Una delle raccomandazioni suggerite è l'uso prudente e responsabile di questa classe antimicrobica inserendo frasi precauzionali negli RCP (Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto) dei prodotti a base di FLQ (Ministero della Salute italiano, 2008):

*“L'utilizzo dei FLQ deve limitarsi al trattamento di condizioni cliniche che hanno risposto o che si ritiene possano rispondere in modo insufficiente ad antibiotici di altre classi.*

*Se possibile, i FLQ devono essere usati esclusivamente in base ai risultati dell'antibiogramma. Durante l'uso del medicinale veterinario, è necessario attenersi ai regolamenti ufficiali e locali sull'uso di prodotti antimicrobici.*

*Un utilizzo di tali prodotti diverso dalle istruzioni fornite nell'RCP può condurre ad un aumento della prevalenza dei batteri resistenti ai FLQ e allo stesso tempo ridurre l'efficacia del trattamento con altri chinoloni a causa della resistenza crociata”.*

Recentemente l'OIE (2018) ha pubblicato una lista dei principali antibiotici utilizzati in veterinaria considerati di importanza critica per alcune patologie animali e per i quali è essenziale prevenire lo sviluppo di resistenza batterica (Figura 3). In questa lista gli

## Capitolo 1 Informazioni Generali

antibiotici utilizzati in campo veterinario sono suddivisi in funzione della loro criticità per la prevenzione di insorgenza di resistenza.

Come si evince dalla tabella tutti i chinoloni sono classificati come Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents.

*Figura 3 - Categorizzazione dei principali antibiotici veterinari utilizzati in animali produttori di derrate alimentari per l'uomo (Estratto -OIE, 2018).*

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	VCIA	VHIA	VIA
<b>PLEUROMUTILINS</b> Tiamulin Valnemulin	AVI, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, SUI	<b>The class of pleuromutilins is essential against respiratory infections in pigs and poultry.</b>  <b>This class is also essential against swine dysentery (<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>) however it is only available in a few countries, resulting in an overall classification of VHIA.</b>		X	
<b>POLYPEPTIDES</b>					
Enramycin Gramicidin Bacitracin	AVI, SUI EQU AVI, BOV, LEP, SUI, OVI	Bacitracin is used in the treatment of necrotic enteritis in poultry.  This class is used in the treatment of septicaemias, colibacillosis, salmonellosis, and urinary infections.		X	
<b>POLYPEPTIDES CYCLIC</b>					
Colistin Polymixin	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, AVI	Cyclic polypeptides are widely used against Gram negative enteric infections.			
<b>QUINOLONES</b>					
<b>QUINOLONES FIRST GENERATION</b>					
Flumequin Miloxacin Nalidixic acid Oxolinic acid	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI PIS BOV AVI, BOV, LEP, PIS, SUI, OVI	Quinolones of the 1st generations are used in the treatment of septicaemias and infections such as colibacillosis.		X	
<b>QUINOLONES SECOND GENERATION (FLUOROQUINOLONES)</b>					
Ciprofloxacin Danofloxacin Difloxacin Enrofloxacin Marbofloxacin Norfloxacin Ofloxacin Orbifloxacin Sarafloxacin	AVI, BOV, SUI AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, BOV, LEP, SUI AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, EQU, LEP, SUI AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, SUI BOV, SUI PIS	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make fluoroquinolones extremely important for veterinary medicine.  Fluoroquinolones are critically important in the treatment of septicaemias, respiratory and enteric diseases.	X		

VCIA Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents; VHIA: Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents; VIA: Veterinary Important Antimicrobial Agents

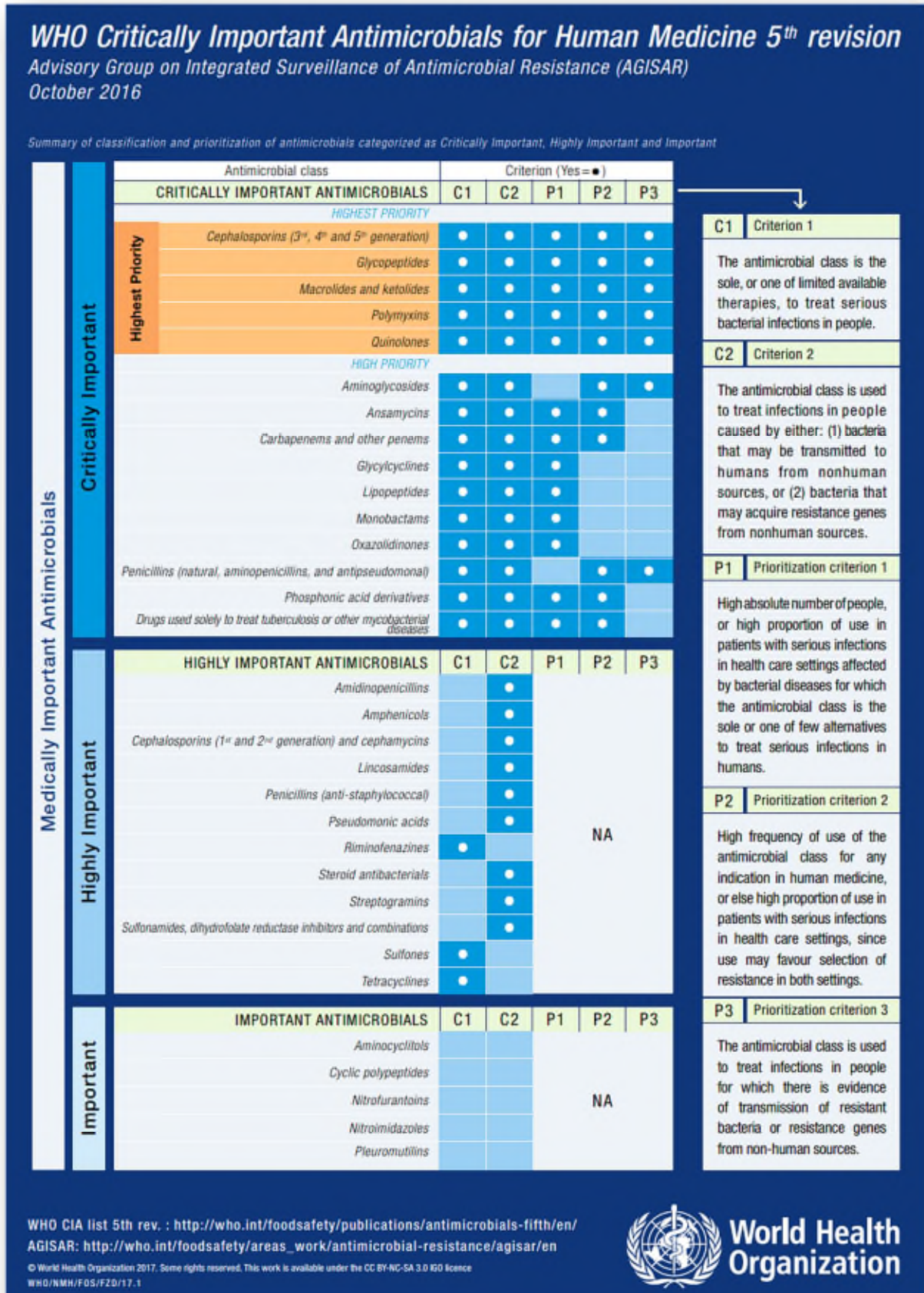
Anche nell'ultimo report WHO (2016) i chinoloni sono considerati tra le molecole ad importanza critica per il trattamento di patologie in medicina umana (Figura 4).

Alla luce del largo impiego dei FLQ in medicina veterinaria e delle raccomandazioni a livello mondiale di un uso prudente di queste molecole è necessario procedere con una approfondita rivalutazione degli approcci terapeutici con questi farmaci in modo



particolare negli animali produttori di derrate alimentari al fine di utilizzare dosi e schemi terapeutici che siano efficaci e al tempo stesso che abbiano un ampio margine di sicurezza.

Figura 4 - Classificazione delle principali classi antibiotiche in base all'importanza per la terapia nell'uomo (WHO, 2016).



### Riferimenti bibliografici

**Andraud M., Chauvin C., Sanders P., Laurentie M. (2011)** - "Pharmacodynamic Modeling of *In Vitro* Activity of Marbofloxacin against *Escherichia coli* Strains" – Antimicrob. Agents Chemother., 55, (2), pg. 756-761

**Blondeau J.M. (2004)** Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. Surv. of Ophtal. 49 (2), pg. 73-78

**EMA-European Medicines Agency (2006)** - "Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food producing animals - Precautions for use in the SPC regarding prudent use guidance" - EMEA/CVMP/416168/2006-FINAL, pg. 1-2

**EMA-European Medicines Agency (2009)** - "CVMP Referral Assessment Report for Veterinary Medicinal Formulations Containing Quinolones and Fluorquinolones to any Food Producing Species - Procedure No: EMEA/V/A/049 Referral Under Article 35 of Directive 2001/82/EC, as amended - EMEA/CVMP/613304/2009, pg. 1-42

**EMA-European Medicines Agency (2010)** - "Final opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use Pursuant to Article 35 of Directive 2001/82/EC for Veterinary medical Product" - EMA/CVMP/97664/2010, pg. 1-140

**EMA-European Medicines Agency (2017)** - "Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 30 European Countries in 2015 - Trends from 2010 to 2015" Seventh ESVAC, Report EMA/184855/2017, pg. 1-184

**EMA-ECDC/EFSA/EMA (2017)** – "Second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals", pg. 1-135

**GISIO Gruppo Italiano Studio Igiene Ospedaliera (2017)** - "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020" - Società Italiana di Igiene, Medicina preventiva e Sanità pubblica (SItI), pg. 1-80

**Garau J. (2000)** – "Update on cross-resistance of fluoroquinolones". Int. J. Clin. Pract. Suppl., 115:94-98.

**Gibson J.S., Cobbold R.N., Kyaw-Tanner M.T., Heisig P., Trott D.J. (2010a)** – "Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections in dogs". Vet. Microbiol. 146(1-2):161-6.

**Gibson J.S., Cobbold R.N., Heisig P., Sidjabat H.E., Kyaw-Tanner M.T., Trott D.J. (2010b)** – "Identification of Qnr and AAC(6)-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals". Vet Microbiol. 143(2-4):329-36.

**Huguet A., Pensec J., Soumet C. (2013)** - "Resistance in *Escherichia coli*: variable contribution of efflux pumps with respect to different fluoroquinolones". J Appl Microbiol. 114(5):1294-9.

**Jacoby G.A. (2005)**- "Mechanisms of resistance to quinolones". Clin Infect Dis. 41 Suppl 2:S120-6.

**Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali - Dipartimento per la sanità pubblica veterinaria, la nutrizione e la sicurezza degli alimenti (2008)** - "Frase precauzionali da includere nel Sommario delle Caratteristiche del Prodotto (SPC) dei medicinali veterinari contenenti chinoloni e fluorochinoloni" - Ministero della Salute Protocollo N.0021460-P-29/10/20118, pg. 1-4

**OIE -World Organisation for Animal Health (2018)** - OIE list of antimicrobial agents of veterinary Importance. May 2018, pg. 1-10

## Capitolo 1 Informazioni Generali

**Pallo-Zimmerman L.M., Byron J.K., Graves T.K. (2010)** - "Fluoroquinolones: Then and Now" - Compendium: Continuing Education for Veterinarians, (7), pg. 1-9

**Poirel L., Rodriquez-Martinez J.M., Mammeri H., Liard A., Nordmann P. (2005)** – "Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnRA" - Antimicrob. Agents Chemother. 49 (8), pg. 3523-5

**Sanders C.C. (2001)** – "Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones". Clin Infect Dis. 32 Suppl 1:S1-8.

**Vanni M., Merenda M., Barigazzi G., Garbarino C., Luppi A., Tognetti R., Intorre L. (2012)** – "Antimicrobial resistance of Actinobacillus pleuropneumoniae isolated from swine" Vet Microbiol. 156(1-2):172-7.

**Tran J.H., Jacoby G.A. (2002)** – "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance". Proc Natl Acad Sci U S A. 99(8):5638-42.

**Trouchon T. e Lefebvre S. (2016)** - "A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use" - Open Journal of Veterinary Medicine, 6, pg. 40-58

**Usui M., Uchiyama M., Baba K., Nagai H., Yamamoto Y., Asai T. (2011)** – "Contribution of enhanced efflux to reduced susceptibility of Salmonella enterica serovar Choleraesuis to fluoroquinolone and other antimicrobials". J Vet Med Sci. 73(2):279-82.

**WHO-World Health Organisation (1998)** - "Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health" - Report of a WHO Meeting , Geneva, Switzerland 2-5 June 1998, WHO/EMC/ZDI/98.10 pg. 1-20

**WHO-World Health Organisation (2016)** - "WHO Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5<sup>th</sup> revision" - Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) WHO/NMH/FOS/FZD/17.1, pg. 1

## 1.2. MARBOFLOXACINA

### 1.2.1. Caratteristiche della molecola

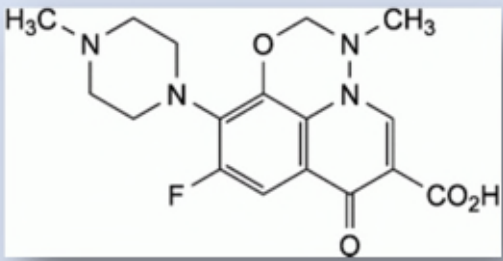
La marbofloxacinina è un fluorochinolone di terza generazione che viene utilizzato esclusivamente in medicina veterinaria (Aliabadi e Lees, 2002; Schneider et al. 1996).

La struttura base della molecola è costituita da un nucleo aromatico eterociclico, il chinolone, un gruppo chetonico in posizione para dell'azoto eterociclico e un gruppo carbossilico (Hooper e Wolfson, 1993). Il gruppo carbossilico in C6 conferisce alla molecola un carattere acido e l'anello piperazinico un carattere basico: la marbofloxacinina è quindi anfotera. L'aggiunta di un gruppo metile in posizione para sull'anello piperazinico ne aumenta la liposolubilità migliorandone le caratteristiche cinetiche. La marbofloxacinina si distingue dagli altri fluorochinoloni per l'anello oxadiazinico (Stratton, 1995; Hooper, 2001; Blondeau, 2004; Hooper e Wolfson, 1993).

Marbofloxacinina è caratterizzata da uno spettro antibatterico ampio, infatti risulta attiva contro Gram-negativi, Gram-positivi, nonché *Micoplasmi* e altri agenti patogeni intracellulari (Thomas et al., 2003; Meunier et al., 2004). Infatti, il nucleo chinolonico conferisce alla molecola un'attività antibatterica diretta essenzialmente contro i batteri Gram negativi. L'atomo di fluoro potenzia l'attività battericida allargando lo spettro ai batteri Gram positivi. L'anello piperazinico amplia ulteriormente lo spettro comprendendo *Pseudomonas spp* e *Micoplasmi*.

In Tabella 5 sono riportate le principali caratteristiche chimico fisiche di marbofloxacinina.

Tabella 5 - Proprietà chimiche e fisiche del principio attivo Marbofloxacina.

Marbofloxacina	
<b>Struttura chimica:</b>	 <p>The image shows the chemical structure of Marbofloxacin. It consists of a central benzene ring fused to a pyridine ring and a benzoxazine ring. The benzene ring has a fluorine atom at the 9-position and a piperazine ring at the 2-position. The pyridine ring has a methyl group on the nitrogen and a carboxylic acid group at the 6-position. The benzoxazine ring is fused to the pyridine ring at the 3 and 4 positions.</p>
<b>Formula molecolare:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<b>Massa molecolare relativa:</b>	362.4
<b>CAS Number:</b>	115550-35-1
<b>Denominazione chimica:</b>	9-Fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido-[3,2,1-ij][4,1,2]benzoxadiazine-6-carboxylic acid.
<b>Aspetto:</b>	Polvere cristallina di colore giallo chiaro
<b>Solubilità:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acqua: poco solubile</li> <li>- cloruro di metilene: moderatamente solubile</li> <li>- etanolo 96%: molto poco solubile</li> </ul>
<b>Punto di fusione:</b>	268 °C
<b>Coefficiente di partizione</b>	P: 1.46x10 <sup>-01</sup>
<b>Octanolo/acqua a pH 7e 20°C:</b>	Log P: -0.835

Queste caratteristiche conferiscono alla molecola un comportamento cinetico eccellente: la biodisponibilità è quasi del 100% con somministrazione orale e parenterale, la distribuzione è molto ampia ed uniforme nell'organismo (tessuti, compartimenti intra ed extracellulari), con elevato volume di distribuzione in polmone, fegato e reni dove si raggiungono concentrazioni superiori a quelle plasmatiche (Dorey et al., 2017).

La percentuale di legame con le proteine è bassa, la clearance non è elevata e l'emivita è lunga; l'eliminazione avviene principalmente tramite le urine e in parte, circa un terzo, tramite le feci (Vetoquinol, 1999).



### 1.2.2. Meccanismo d'azione

La marbofloxacinina ha una struttura piana che le permette di penetrare nel batterio per semplice diffusione. Il bersaglio dell'azione è l'enzima batterico DNA girasi. Questo enzima è responsabile del super avvolgimento del DNA batterico, che permette di comprimere 1.300  $\mu\text{m}$  di DNA nella cellula che misura circa 2  $\mu\text{m}$ .

Grazie all'irreversibilità dell'inibizione specifica di questo super avvolgimento, la marbofloxacinina causa la morte dei batteri principalmente con un meccanismo che si manifesta sui batteri in fase di moltiplicazione inibendo la replicazione cellulare, bloccando la respirazione e portando quindi a morte il batterio. Alcuni Autori (Vetoquinol, 1999) suggeriscono anche un altro meccanismo tipico dei fluorochinoloni, che non necessita né della divisione cellulare, né della sintesi proteica.

La marbofloxacinina, contrariamente a numerosi antibiotici battericidi, attacca i costituenti interni del batterio in particolare il materiale genetico. In questo modo, i batteri vengono distrutti con un processo di filamentazione, senza che la parete batterica si rompa. Questo limita la dispersione di endotossine nell'organismo che causerebbe il rapido peggioramento delle condizioni generali dell'animale (Vetoquinol, 1999).

Questi meccanismi permettono a marbofloxacinina di inibire sia i germi in replicazione sia quelli quiescenti.

### 1.2.3. Efficacia antimicrobica

Sulla base del loro effetto gli agenti antibatterici vengono classificati come concentrazione dipendenti (l'attività battericida aumenta all'aumentare della concentrazione) o tempo dipendenti (l'attività battericida è determinata dal tempo di esposizione a concentrazioni stabili di antibatterico anche di poco superiori alle MIC). La marbofloxacinina è un antimicrobico comunemente riconosciuto come concentrazione-dipendente. Tuttavia, sebbene l'attività battericida sia strettamente legata ai livelli di concentrazione, la durata di esposizione ha comunque un ruolo importante sull'effetto battericida.

In funzione dei patogeni responsabili dell'infezione e delle specie animali, la conoscenza dei valori di PK/PD che caratterizzano i diversi antibiotici consente

l'ottimizzazione dei dosaggi per garantire l'effetto terapeutico e per ridurre al minimo l'insorgenza di resistenza antimicrobica (Potter et al., 2013).

L'efficacia di marbofloxacin è correlata ai rapporti tra l'area sotto la curva e la minima concentrazione inibente (AUC/MIC) e al rapporto tra concentrazione massima e MIC ( $C_{max}/MIC$ ) (Lees e Aliabardi, 2002; Nielsen et al., 2011; Vilalta et al., 2014).

Inoltre, i nuovi approcci nell'integrazione farmacocinetica / farmacodinamica hanno suggerito che la marbofloxacin (autorizzata per il trattamento della malattia respiratoria bovina e suino ad un dosaggio giornaliero di 2 mg/kg per 3-5 giorni), sarebbe ugualmente clinicamente efficace a dosi singole di 8-10 mg/kg, riducendo anche il rischio di resistenza (Vallé et al., 2011; Schneider et al. 2014).

Considerando le raccomandazioni internazionali sull'uso prudente dei fluorochinoloni, sono stati condotti svariati studi retrospettivi riportati in bibliografia che hanno valutato la sensibilità di vari patogeni nei confronti di marbofloxacin per valutare l'eventuale insorgenza di resistenze. La trattazione dei livelli di resistenza dei principali patogeni causa di patologia respiratoria nel suino (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*) è trattata nel paragrafo 1.3.

### 1.2.4. Tossicità

Studi di tossicità condotti su ratti indicano che marbofloxacin presenta bassa tossicità acuta e cronica (EMA, 1996; EMA, 1999).

Come tutti i chinoloni, marbofloxacin può determinare problemi articolari inclusi dolore e distorsioni in animali giovani. Sebbene non siano stati condotti studi di tossicità cronica specifici per marbofloxacin, si ritiene che al pari degli altri fluorochinoloni, non abbia effetti sulla riproduzione (FSCJ, 2007).

Non ci sono dati sulla cancerogenicità. Confrontando i risultati dei test di mutagenicità con marbofloxacin con quelli ottenuti per altri fluorochinoloni l'EMA ha valutato che non c'era motivo di sospettare che la marbofloxacin fosse cancerogena. (EMA, 1996, EMA, 1999). In generale, non è riconosciuta alcuna cancerogenicità nei nuovi farmaci chinolonici ed è improbabile che la marbofloxacin mostri genotossicità da destare preoccupazione (FSCJ, 2007).

### Riferimenti bibliografici

- Aliabadi F.S., Lees P. (2002)** - "Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 25, (3), pg. 161-174
- Blondeau J.M. (2004)** - "Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance" – Sur. Ophthal., 49, (Suppl.2), pg. S73-S78
- Dorey L., Hobson S., Lees P. (2017)** - "Potency of marbofloxacin for pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*: comparison of growth media" - Res. Vet. Sci., 111, pg. 43-48
- EMEA (1996)** - Committee for Veterinary Medical products - MARBOFLOXACIN - Summary Report 1 EMEA/MRL/079/96-FINAL
- EMEA (1999)** - Committee for Veterinary Medical products - MARBOFLOXACIN - Summary report 2 EMEA/MRL/693 /99-FINAL
- FSCJ (2007)** - Risk Assessment Report on Marbofloxacin Food Safety Commission of Japan, pg. 1-4
- Hooper D.C. (2001)** - "Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones Mechanisms of Fluoroquinolone" – *Clin. Infect. Dis.* 32, (Suppl 1), pg. S9-S15
- Hopper D.C., Wolfson J.S. (1993)** - "Echanism of Quinolones Action and Bacterial Killing" - Quinolones antimicrobial Agents, 2nd Ed.
- Lees P., Aliabadi F.S. (2002)** - "Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans" - Int. J. Antimicrob. Agents, 19, (4), pg. 269-284
- Meunier D., Acar J.F., Martel J.L., Kroemer S., Valle M. (2004)** - "Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries" - Int. J. Antimicrob. Agents, 24, (3), pg. 70-80
- Nielsen E.I., Cars O., Friberg L.E. (2011)** "Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization" - Antimicrob. Agents Chemother., 55, (10), pg. 4619-4630
- Potter T., Illambas J., Pelligand L., Rycroft A., Lees P. (2013)** - "Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*" – Vet. J. 195, pg. 53–58
- Schneider M., Thomas V., Boisrame B., Deleforge J. (1996)** - "Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 19, (1), pg. 56–61
- Schneider M., Paulin A., Dron F., Woehrlé F. (2014)** Pharmacokinetics of marbofloxacin in pigs after intravenous and intramuscular administration of a single dose of 8 mg/kg: dose proportionality, influence of the age of the animals and urinary elimination. J. Vet. Pharmacol. Ther 37:523-30
- Stratton C.W. (1995)** "Mechanisms of Activity and Resistance for Fluoroquinolones" - Antimicrob. Infect. Dis. Newsletter, 14, (10), pg. 69-72
- Thomas A., Nicolas C., Dizier I., Mainil J., Linden A. (2003)** "Antibiotic susceptibilities of recent isolates of mycoplasma bovis in Belgium" - Vet. Rec., 153, (14), pg. 428-431

## Capitolo 1 Informazioni Generali

**Vallè M., Scheneider M., Galland D., Giboin H., Woehrle F. (2011)** “Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease”. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 35, pg. 519-528

**Vetoquinol (1999)** “Marbocyl Marbofloxacin” - Reference Book, pg. 1-104

**Vilalta C., Giboin H., Schneider M., El Garch F., Fraile L. (2014)** - “Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of marbofloxacin in the treatment of *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in nursery and fattener pigs using Monte Carlo simulations” - *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 37, (6), pg. 542-549

### 1.3. PRINCIPALI PATOGENI RESPIRATORI DEL SUINO SENSIBILI A MARBOFLOXACINA

Di seguito vengono riassunte le caratteristiche di tre principali patogeni che sono causa di malattie respiratorie nel suino: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*.

#### 1.3.1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* è un batterio Gram-negativo a forma di bastoncino appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae. È l'agente eziologico della Pleuropolmonite Contagiosa Suina (PCP) una malattia respiratoria altamente contagiosa che è responsabile delle maggiori perdite economiche nell'industria delle carni suine (Frey, 1995a; Bossé et al., 2002; Buettner et al., 2011).



Microscopia elettronica a scansione di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pinterest.it-immagine on line).

### **Patogenesi della malattia**

Nel 1964, Shope fu il primo a descrivere una malattia che colpiva i suini in Argentina come la pleuropolmonite contagiosa dei suini e chiamò l'agente eziologico *Haemophilus pleuropneumoniae* (Shope, 1964, Shope et al., 1964). Nel 1983, Pohl e collaboratori trasferirono gli agenti causali di PCP o infezioni simili al genere *Actinobacillus* sulla base dell'omologia di sequenza del DNA, più simile al genere *Actinobacillus* (*Actinobacillus lignieresii*, 72-75%) (Nicolet, 1988; Pohl et al., 1983).

La malattia è caratterizzata da una polmonite essudativa, fibrinosa, emorragica e necrotizzante associata a pleurite (Chen et al., 2011). La pleuropolmonite suina ha una specificità per l'ospite maiale e viene trasmessa tramite aerosol o contatto diretto con animali infetti, inclusi i portatori asintomatici. Le infezioni cliniche possono risultare in una forma cronica e persistente, una forma acuta o una forma iperacuta associata a grave patologia e morte rapida (Frey, 1995b; Gottschalk, 2015; Chiers et al., 2010; Opriessnig et al., 2011; Gómez-Laguna et al.; 2014; Dayao et al.; 2016; Schmidt et al., 2016). La malattia acuta è caratterizzata da: ampia emorragia, essudazione fibrinosa e necrosi nei polmoni e nella cavità pleurica. Le infezioni subcliniche e croniche sono comuni e possono fungere da serbatoio per la trasmissione della malattia (Nicolet, 1992; Jobert et al. 2000).

### **Tipizzazione e diffusione di *Actinobacillus pleuropneumoniae***

*Actinobacillus pleuropneumoniae* è ora diviso in due biotipi in base al requisito NAD per la crescita: il NAD-dipendente (biotipo 1) e NAD-indipendente (biotipo 2) (Gottschalk, 2015; Turni et al., 2014).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* è ulteriormente suddiviso in 16 sierotipi sulla base delle proprietà antigeniche dei polisaccaridi capsulari e della catena O dei lipopolisaccaridi di superficie (LPS) (Bossé et al., 2010; Sárközi et al., 2015; Kim et al., 2016). I sierotipi 1-12 e 15 appartengono al biotipo 1, mentre i sierotipi 13 e 14 sono biotipo 2.

Il sierotipo 16 non è ancora ufficialmente raggruppato in alcun biotipo. I sierotipi 1 e 5 sono più spesso coinvolti in focolai acuti e solitamente fatali della malattia. Tuttavia, questa non è una regola assoluta poiché le varianti di sierotipo 2, 4, 7, 9 e 11 sono state identificate come NAD indipendenti (biotipo 2) (Gottschalk, 2015; Serrano et al., 2008).

Nonostante la distribuzione globale di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la prevalenza di diversi sierotipi varia da Paese a Paese. In particolare, i sierotipi 1, 5 e 7 si riscontrano prevalentemente in Nord America, il sierotipo 2 è il tipo più comune in Europa e i sierotipi 1, 3, 4, 5 e 7 sono isolati in Cina (Buettner et al., 2011; Gottschalk e Lacouture, 2015; Morioka et al., 2016). Per il Sud America, i sierotipi 4, 6 e 7 sono riportati come i sierotipi dominanti nella regione (Gómez-Laguna et al., 2014).

### Virulenza

L'infezione e la persistenza di *Actinobacillus pleuropneumoniae* sono mediate da molteplici fattori di virulenza. Vi sono prove considerevoli che le quattro tossine RTX prodotte (ApxI-ApxIV) siano tra i principali fattori che contribuiscono alla sua virulenza (Welch, 2001; Welch et al. 1995; Bosse et al. 2002).

E' stato dimostrato in vitro che l'attività delle quattro tossine RTX di *Actinobacillus pleuropneumoniae* si manifesta su eritrociti, leucociti, cellule epiteliali alveolari e/o cellule endoteliali suine. In generale, ApxI è fortemente emolitico e citotossico, ApxII è debolmente emolitico e moderatamente citotossico, mentre ApxIII è fortemente citotossico, ma non emolitico (Frey, 1995b). Il gene nativo di ApxIV è stato espresso solo in vivo, sebbene una proteina ApxIV ricombinante a coda istidina prodotta in *E. coli* fosse debolmente emolitica (Schaller et al. 1999). Tutti i sierotipi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* codificano per almeno due tossine RTX, ad esempio, i sierotipi 1 e 5 altamente virulenti producono sia ApxI che ApxII e contengono il gene ApxIV (Frey, 1995b; Schaller et al. 1999).

Altri fattori di virulenza ben caratterizzati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* includono: lipopolisaccaride (LPS), capsula polisaccaridica (CPS), proteasi (ad es. LonA), ureasi, enzimi, sistemi di acquisizione di ferro coinvolti nella respirazione anaerobia (es. sistema di trasduzione del segnale a due componenti [TCSTS] arcB e arcA), pilus di tipo IV, Flp pilus, autotrasportatori (ad es. Trimeric Autotransporter Adhesin [TAA]) e più recentemente biofilm (Bossè et al. 2002; Chiers et al., 2010; Tremblay et al., 2017). Il ruolo del biofilm nella persistenza, sopravvivenza e patogenesi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* è relativamente nuovo e la sua importanza non è completamente compresa.

### Resistenza

Attualmente, gli antibiotici rappresentano la misura più efficace per controllare i focolai di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2015). Per il trattamento di *Actinobacillus pleuropneumoniae* viene utilizzata un'ampia varietà di agenti antimicrobici:  $\beta$ -lattamici (amoxicillina, penicillina, ampicillina e ceftiofur), tetracicline (tetraciclina e doxiciclina), florfenicolo, trimetoprim/sulfametossazolo, tiamulina, lincomicina /spectinomina, fluorochinoloni (danofloxacin, enrofloxacin e marbofloxacin) e gentamicina (Dayao et al., 2014 e 2016). Negli ultimi anni, sono stati scoperti isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* con diversi livelli di resistenza in tutto il mondo (Archambault et al., 2012; Dayao et al., 2014; Hathroubi et al., 2015).

Di seguito sono ripostati i dati raccolti in uno studio retrospettivo per valutare i tassi di resistenza ad alcuni antimicrobici di vari ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolati da suini in Italia dal 1994 al 2009 (Vanni et al., 2012).

Nello studio sono stati inclusi un totale di 992 isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (586 appartenenti al biotipo 1 e 406 appartenenti al biotipo 2) prelevati dai polmoni di suini morti di malattie respiratorie acute. Gli isolati sono stati raccolti dal 1994 al 2009 nelle Sezioni Diagnostiche di Parma e Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, che ricevono regolarmente campioni da quasi 12.000 allevamenti suini del centro e nord Italia. Gli animali non erano stati trattati con agenti antimicrobici nelle 3 settimane precedenti la raccolta del campione. I tassi di resistenza di *Actinobacillus pleuropneumoniae* sono mostrati nella Tabella 6.



## Capitolo 1 Informazioni Generali

Tabella 6 - Resistenza ad alcuni antibiotici di 992 ceppi di *Actinobacillus pleuropneumonie* isolati in suini in Italia (1994-2009) (Estratto da Vanni et al., 2012).

Antimicrobials (no. of tested isolates)	% of resistant isolates <sup>a</sup> (no. of tested isolates)																Statistical analysis	
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	P <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>
<b>Penicillins</b>																		
Amoxicillin (755)	11.1 (27)	13.7 (51)	23.3 (43)	14.3 (7)	52.5 (40)	56.8 (74)	63 (81)	62.1 (66)	52.8 (108)	80 (70)	64.5 (31)	51 (51)	81.5 (27)	77.8 (27)	69 (29)	82.6 (23)	<0.0001	0.86
Amoxicillin/clav. ac.(774)	-	-	-	-	0 (24)	5.3 (76)	2.7 (74)	3 (67)	3.8 (105)	7.3 (124)	3.5 (57)	4.8 (62)	4.3 (47)	9.8 (51)	9.5 (42)	8.9 (45)	0.027	0.79
Ampicillin (943)	14.8 (27)	14.8 (54)	20 (45)	28 (25)	51.2 (43)	52.8 (72)	62 (79)	61.5 (65)	55.3 (94)	61 (123)	59.6 (52)	48.4 (48)	64.6 (48)	66.7 (51)	69.4 (49)	69.2 (52)	<0.0001	0.86
Penicillin G (816)	18.5 (27)	17.3 (52)	10.7 (28)	-	-	47.1 (34)	64.6 (82)	62.1 (66)	75 (100)	78.2 (124)	77.6 (58)	64.5 (62)	85.4 (48)	80.8 (52)	84 (50)	72.7 (33)	<0.0001	0.84
<b>Cephalosporins</b>																		
Cefquinome (294)	-	-	-	-	-	-	-	-	16.4 (61)	12.7 (71)	6.5 (31)	16.7 (30)	3.7 (27)	29.6 (27)	42.3 (26)	23.8 (21)	0.007	0.59
Ceftiofur (733)	-	-	-	-	-	5.9 (34)	8.5 (82)	1.5 (66)	7.3 (110)	12 (125)	4.1 (49)	15.6 (64)	8.2 (49)	13.5 (52)	16 (50)	7.7 (52)	0.055	0.52
Cephalexin (417)	-	-	30.4 (23)	0 (25)	22.2 (27)	34.1 (44)	-	-	42.9 (63)	29.4 (68)	17.2 (29)	25.8 (31)	11.1 (27)	40.7 (27)	56.7 (30)	21.7 (23)	0.13	0.3
<b>Tetracyclines</b>																		
Doxycycline (206)	-	-	-	-	-	-	-	-	54.2 (59)	43.8 (64)	17.2 (29)	-	52.9 (17)	44.4 (27)	50 (6)	25 (4)	0.27	-0.26
Tetracycline (964)	59.3 (27)	59.6 (52)	46.7 (45)	40.7 (27)	72.5 (40)	83.3 (78)	63.9 (83)	60 (65)	67.6 (105)	69.5 (118)	43.9 (57)	55.4 (65)	67.3 (49)	61.5 (52)	70 (50)	58.8 (51)	0.81	0.15
<b>Fluoroquinolones</b>																		
Danofloxacin (679)	-	-	-	-	-	13.3 (75)	15 (60)	25.9 (58)	20.7 (82)	19.5 (123)	19 (58)	23.8 (63)	16.3 (49)	19.6 (51)	16.7 (12)	10.4 (48)	0.81	-0.21
Enrofloxacin (879)	0 (3)	3 (33)	4.7 (43)	0 (10)	16.3 (43)	15.4 (78)	15.9 (69)	16 (50)	9.6 (114)	19.1 (110)	8.6 (58)	7.8 (64)	8.2 (49)	9.4 (53)	24 (50)	9.6 (52)	0.37	0.46
Flumequine (837)	0 (15)	0 (6)	50 (2)	20 (10)	20 (35)	21.8 (78)	21 (81)	20.9 (67)	23.2 (112)	18.3 (109)	19 (58)	16.1 (62)	16.7 (48)	17.3 (52)	18 (50)	15.4 (52)	0.66	0.018
Marbofloxacin (647)	-	-	-	-	-	-	16.7 (36)	14.1 (64)	10.5 (105)	11.2 (125)	8.9 (56)	13.1 (61)	10.4 (48)	11.8 (51)	6 (50)	2 (51)	0.03	-0.8
<b>Macrolides</b>																		
Tilmicosin (826)	-	28.6 (14)	25 (36)	30 (20)	64.9 (37)	67.1 (76)	58.8 (80)	89.5 (38)	91 (89)	74.4 (125)	65.5 (58)	65.1 (63)	67.3 (49)	80.8 (52)	60 (50)	51.3 (39)	0.002	0.49
Tulathromycin (235)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42.9 (21)	63.9 (61)	58.3 (48)	69.8 (53)	65.2 (46)	66.7 (6)	0.15	0.74

Durante l'intero periodo di studio gli isolati hanno mostrato un aumento statisticamente significativo della resistenza a: amoxicillina (dal 11,1% al 82,6%), ampicillina (dal 14,8% al 69,2%), penicillina G (dal 18,5% al 72,7%), cefquinome (dal 16,4 % al 23,8%) e cotrimoxazolo (dal 11,5% al 32,7%). Un significativo aumento dei tassi di resistenza è stato osservato anche per l'associazione amoxicillina e acido-clavulanico (dallo 0% all'8,9%, 1998-2009) e tilmicosina (dal 28,6% al 51,3%, 1995-2009), mentre una significativa diminuzione nel tempo è stata osservata per gentamicina (dal 92,1% al 63,6%) e marbofloxacin (dal 16,7% al 2%, 2000-2009). Non sono stati osservati cambiamenti significativi nella resistenza per ceftiofur, cefalexina, doxiciclina, tetraciclina, enrofloxacin, danofloxacin, flumequina, lincomicina, tulatromicina, tiamfenicolo, florfenicolo, streptomina, kanamicina e tiamulina (Vanni et al. 2012).

In conclusione, gli isolati raccolti in Italia dal 1994 al 2009 hanno mantenuto un'alta suscettibilità agli agenti antimicrobici solitamente efficaci contro *Actinobacillus pleuropneumoniae* come florfenicolo, ceftiofur e fluorochinoloni. Tuttavia, la crescente resistenza agli antimicrobici utilizzati nella terapia della pleuropneumonia suina, come i sulfamidici potenziati e le penicilline, conferma l'importanza della sorveglianza continua degli isolati clinici. Quando è richiesto un trattamento antimicrobico, i principi dell'uso prudente degli antibiotici consigliano di effettuare una diagnosi accurata e di utilizzare colture e dati di sensibilità antimicrobica a supporto della terapia di scelta (Vanni et al. 2012).

Poiché gli antibiotici erano spesso usati in allevamenti a dosi subterapeutiche per la promozione e la prevenzione della crescita, l'uso prudente e responsabile degli antibiotici nella produzione di suini è altamente consigliato.

Il monitoraggio della resistenza antimicrobica è uno degli aspetti più importanti che oggi impegna molti Gruppi di lavoro a livello mondiale. Tra questi il CEESA (Executive Animal Health Study Center) si sta adoperando attraverso il VetPath program a collezionare ceppi batterici dei principali patogeni causa di malattie in animali da produzione alimentare (specialmente bovini, suini e pollame) nei vari Paesi Europei, al fine di armonizzare modelli di campionamento, isolamento e identificazione.

Uno studio recente pubblicato dal VetPath Study Group riporta i dati riferiti ad alcuni patogeni, tra cui *Actinobacillus pleuropneumoniae*, isolati nel tratto respiratorio ed

## Capitolo 1 Informazioni Generali

enterico così come nelle meningi di suino, collezionati dal 2009-2012 in 8 diversi Paesi EU (Belgio, Danimarca Francia, Germania, Olanda Polonia, Spagna e UK) (Klein et al., 2015).

I campioni sono stati prelevati da animali con sintomatologia acuta e non trattati con antibiotici nei 15 giorni precedenti il campionamento.

Tabella 7 - Valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> e range (mg/L) per diversi antimicrobici nei confronti di alcuni ceppi di *A. pleuropneumoniae* isolati da allevamenti suini in 8 Paesi EU dal 2009 al 2012 (Estratto Klein et al., 2015)

	App (n=157)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC Range
Amoxicillin	0.25	32	0.12-≥128
Amoxicillin/ clavulanic acid	0.25	0.5	0.12-2
Apramycin	-	-	-
Cefquinome	0.015	0.03	≤0.004-0.5
Ceftiofur	0.015	0.03	0.008-2
Colistin	-	-	-
Danofloxacin	0.06	0.12	0.015-8
Enrofloxacin	0.03	0.06	0.015-2
<b>Marbofloxacin</b>	0.03	0.06	0.015-2
Florfenicol	0.25	0.5	≤0.12-16
Gentamicin	-	-	-
Lincomycin	32	32	≤4-≥64
Neomycin	-	-	-
Spectinomycin	64	128	8-≥512
Streptomycin	-	-	-
Tetracycline	0.5	16	0.25-≥128
Tiamulin	8	16	2-16
Tilmicosin	16	16	2-32
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0.06	0.12	0.008-≥32
Tulathromycin	32	32	4-64
Tylosin	32	64	4-≥128

-: not tested

Le MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> sono state determinate per vari antibiotici. Tra questi, come mostrato nella Tabella 7, vi è anche la marbofloxacin. Simile piano di sorveglianza era stato effettuato precedentemente (de Jong et al. 2014) sempre dal VetPath Study Group studiando la suscettibilità di alcuni patogeni, responsabili di patologie in bovini, suini e volatili, tra cui *Actinobacillus pleuropneumoniae*, nei confronti di vari antibiotici come marbofloxacin.

I ceppi di patogeni erano stati raccolti anche in questo caso da animali malati provenienti da 11 Paesi EU (dal 2002 al 2006).

Per il suino sono stati isolati un totale di 230 ceppi di *Pasteurella multocida* e 220 ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* recuperati da infezioni respiratorie e 182 ceppi di *S. suis*, da infezioni del tratto respiratorio o da meningiti (Tabella 8).

Tabella 8 - Valori di MIC e suscettibilità di alcuni ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* in 11 paesi Europei isolati in suini dal 2002 al 2006 (de Jong et al., 2014).

Antimicrobial Agent	MIC values (µg/mL)													MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	S (%)	I (%)	R (%)	Kruskal-Wallis test	Dunn test						
	0.002	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8								16	32	64	128	256	512
Amoxicillin				54	31	31	54	69	2	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	0.25	0.5	-	-	-	<0.01	ns
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>a</sup>				1	83	88	42													0.25	0.5	100.0	0.0	0.0	<0.05	ns
Cefquinome	43	75	71	30	1															0.008	0.03	-	-	-	ns	ns
Ceftiofur	27	56	101	32	4															0.015	0.03	100.0	0.0	0.0	<0.01	ns
Cephalexin				6	42	39	61	71	1											1	2	-	-	-	ns	ns
Dasofloxacin			1	15	90	97	9	2	5	0	0	1								0.03	0.06	-	-	-	ns	ns
Enrofloxacin	1	6	78	111	16	6	1	1												0.03	0.06	99.2	0.4	0.4	<0.01	ns
Marbofloxacin	1	5	74	75	47	11	5	1	1											0.03	0.06	-	-	-	<0.01	ns
Flotrenicol				2	184	34														0.25	0.5	100.0	0.0	0.0	<0.02	ns
Doxycycline <sup>b</sup>				3	70	8	6	3	1											0.25	1	-	-	-	ns	ns
Tetracycline <sup>b</sup>				2	32	76						2	11	6						1	16	26.4	58.9	14.7	<0.05	GeoUK
Tiamulin				1	1	2	3	74	121	18										8	8	100.0	-	0.0	ns	ns
Tilanicosin				2	22	147	49													8	16	100.0	-	0.0	ns	ns
Tylosin				1	2	6	15	72	107	17										32	32	-	-	-	ns	ns
Lincomycin				2	5	38	77	98												16	≥32	-	-	-	ns	ns
Trimetho/sulfamethoxazole <sup>c</sup>	4	29	85	67	12	7	4	2	2	1	7									0.03	0.25	94.6	0.9	4.5	ns	ns
Spectinomycin				1	1	3	131	65	19											32	64	-	-	-	<0.05	ns

Come si evince dal confronto dei dati presenti nelle due tabelle, per marbofloxacin i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> (0,03 e 0,006 µg/ml rispettivamente) di *Actinobacillus pleuropneumoniae* sono rimasti invariati dal 2002 al 2012.

### Riferimenti bibliografici

**Archambault M., Harel J., Gouré J., Tremblay Y.D., Jacques M. (2012)** “Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*” – *Microb. Drug Resist.*, 18, (2), pg. 198-206

**Bossé J.T., Sinha S., Li M.S., O’Dwyer C.A., Nash J.H., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R. (2010)** - “Regulation of pga operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by  $\sigma E$  and H-NS” – *J. Bacteriol.*, 192, pg. 2414-2423

**Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., (2002)** - “*Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection” - *Microbes Infect.*, 4, pg. 225-235

**Buettner F., Konze S., Maas A., Gerlach G. (2011)** - “Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*” - *Proteome Sci.*, 9, pg. 1-23

**Chen Z., Chien M.S., Chang N.Y., Chen T.H., Wu C.M., Huang C., Lee W.C., Hsuan S.L. (2011)** - Mechanisms underlying *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI induced expression of IL-1b, IL-8 and TNF-a in porcine alveolar macrophages” – *Vet. Res.*, 42, pg. 2-10

**Chiers K., De Waele T., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2010)** - “Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host” – *Vet. Res.*, 41: 65, pg 1-16

**Dayao D.A., Gibson J.S., Blackall P.J., Turni C. (2014)** - “Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia” – *Vet. Microbiol.*, 171, pg. 232-235

**Dayao D., Gibson J.S., Blackall P.J., Turni C. (2016)** - “Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs” – *Aust. Vet. J.*, 94, (7), pg. 227-231

**De Jong A., Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I., Butty P., Klein U., Marion H., Rigaut D., Valle M. (2014)** - “Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath Study” – *Vet. Microbiol.*, 172, pg. 202-215

**Frey J. (1995a)** - “Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins” - *Trends in Microbiology*, 3, pg. 257-261

**Frey J. (1995b)** - “Exotoxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*” - In: Donachie W., Lainson F.A., Hodgson J.C., Editors, *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, New York: Plenum Press., pg. 101-113

**Gómez-Laguna J., Islas A., Muñoz D., Ruiz A., Villamil A., Carrasco L., Quezada M. (2014)** - “Infection dynamics and acute phase response of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate of moderate virulence in pigs” – *Vet. Microbiol.*, 173(3-4), pg. 332-339

**Gottschalk M. (2015)** - “The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*” – *Vet. J.*, 206, pg. 30-38

**Gottschalk M., Lacouture S. (2015)** “Canada: distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs” – *Can. Vet. J.*, 56, pg. 1093-1094

**Hathroubi S., Fontaine-Gosselin S.È., Tremblay Y.D., Labrie J., Jacques M. (2015)** - “Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*” – *Vet. Microbiol.*, 179, pg. 277-286



- Jobert J.L., Savoye C., Cariolet R., Kobisch M., Madec F. (2000)** - "Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs" - *Can. J. Vet. Res.*, 64, pg. 21-26
- Kim M.Y., Kim T.G., Yang M.S. (2016)** "Production and immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA protein in transgenic rice callus" - *Protein Expr. Purif.* 132; 116-123
- Klein U., Homas .V, De Jong A., Simjee S., Moyaert H., Siegwart E., EL Garch F., Butty P., Marion H., Rigaut D., Haag S., Diergarten S., Richard-Mazet A. (2015)** - "Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012" – *VetPath Poster*
- Morioka A., Shimazaki Y., Uchiyama M., Suzuki S. (2016)** - "Serotyping reanalysis of unserotypable *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates by agar gel diffusion test" – *J. Vet. Med. Sci.e* 78, pg. 723-725
- Nicolet J. (1988)** - "Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*" - *Canadian Veterinary Journal.* 29, pg. 578-580
- Nicolet J. (1992)** - "*Actinobacillus pleuropneumoniae*" - In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J., Editors, *Diseases of swine*, 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, pg. 401-408
- Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G., Halbur P.G. (2011)** - "Polymicrobial respiratory disease in pigs" – *Anim. Health Res. Rev.*, 12, pg. 133-148
- Pohl S., Bertschinger H.U., Frederiksen W., Mannheim W. (1983)** - "Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haerolyticalike* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on 12 S. Hathroubi et al. the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness" – *Intern. J. Syst. Bacte.*, 33, pg. 510-514
- Sárközi R., Makrai L., Fodor L. (2015)** - "Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 16" - *Acta Vet. Hung.*, 63, pg. 444-450
- Schaller A., Kuhn R., Huhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P., Frey J. (1999)** - "Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*" – *Microbiol.*, 145, pg. 2105-2116
- Schmidt C., Cibulski S.P., Andrade C.P., Teixeira T.F., Valera A.P.M., Scheffer C.M., Franco A.C., Almeida L.L., Roehe P.M. (2016)** - "Swine influenza virus and association with the porcine respiratory disease complex in pig farms in southern Brazil" - *Zoonoses and Public. Health*, 63, pg. 234-240
- Serrano L., Tenorio-Gutiérrez V., Suárez F., Reyes-Cortés R., Rodríguez-Mendiola M., Arias-Castro C., Godínez-Vargas D., de la Garza M. (2008)** - "Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay" - *Molecular and Cellular Probes*, 22, pg. 305-312
- Shope R.E. (1964)** - "Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology" – *J. Exp. Med.*, 119, pg. 357-368
- Shope R.E., White D.C., Leidy G. (1964)** - "Porcine contagious pleuropneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent, *Hemophilus pleuropneumoniae*" *J.Exp. Med.*
- Tremblay Y.D.N., Labrie J., Chénier S., Jacques M. (2017)** - "*Actinobacillus pleuropneumoniae* grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our in vitro biofilm assays?" – *Microb. Biotechnol.*, 10, pg. 756-760

## Capitolo 1 Informazioni Generali

**Turni C., Singh R., Schembri M.A., Blackall P.J. (2014)** - "Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15" – *Lett. Appl. Microbiol.*, 59, pg. 362-369

**Vanni M., Merenda M., Barigazzi G., Garbarino C., Luppi A., Tognetti R., Intorre L. (2012)** - "Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine" – *Vet. Microbiol.*, 156, pg. 172-177

**Welch R.A., Bauer M.E., Kent A.D., Leeds J.A., Moayeri M., Regassa L.B., Swenson D.L. (1995)** - "Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins?" - *Infect. Agents Dis.*, 4, pg. 254-272

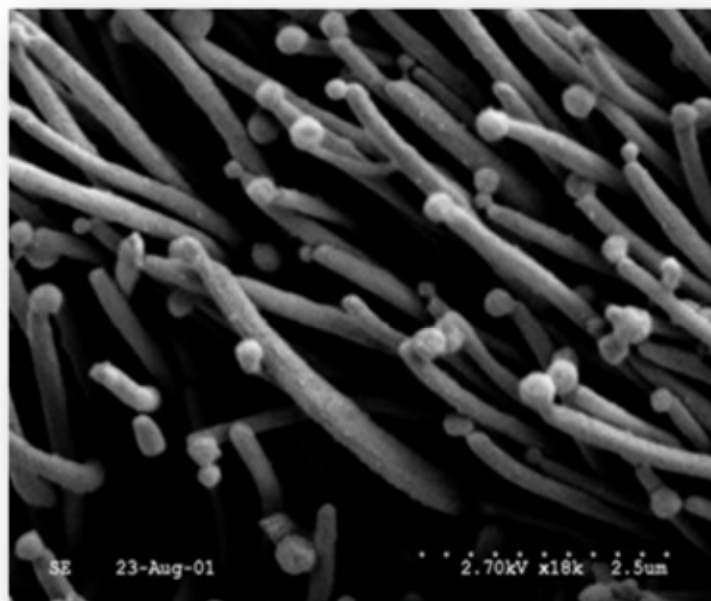
**Welch R.A. (2001)** - "RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology" - *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 257, pg. 85-111

### 1.3.2. *Mycoplasma hyopneumoniae*

*Mycoplasma hyopneumoniae* è l'agente principale della polmonite enzootica, una malattia respiratoria cronica del suino derivante da infezioni respiratorie miste con uno o più patogeni batterici secondari come *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

*Mycoplasma hyopneumoniae* è presente nella maggior parte dei Paesi con produzione intensiva di suini ed è anche considerato uno dei principali patogeni coinvolti nel complesso delle malattie respiratorie dei suini (PRDC).

La tosse non produttiva è il segno clinico più evidente. Le lesioni macroscopiche sono caratterizzate da broncopolmonite catarrale con aree rosse e consolidate purpuree sulle parti cranio-ventrale dei lobi apicali, cardiaci, accessori e diaframmatici. La diagnosi di polmonite enzootica viene generalmente effettuata a livello di gruppo/allevamento piuttosto che a livello di singolo soggetto (Taylor, 2013; Thacker e Minion, 2012).



*Microscopia elettronica di Mycoplasma hyopneumoniae* adeso alle cellule epiteliali ciliate del tratto respiratorio del suino (Pijoan, 2014).



### Patogenesi della malattia

*Mycoplasma hyopneumoniae* è un organismo specifico dell'ospite che infetta i suini. La patogenesi delle infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende varie fasi: colonizzazione delle vie respiratorie, modulazione del sistema immunitario che porta al danneggiamento del tessuto polmonare e persistenza nel tratto respiratorio. Questa complessa patogenesi può anche essere influenzata, principalmente in condizioni di campo, dall'interazione con altri agenti infettivi.

La colonizzazione del tratto respiratorio inizia con l'adesione di *Mycoplasma hyopneumoniae* alle cellule epiteliali ciliate di: trachea, bronchi e bronchioli (Blanchard et al., 1992). L'alterata attività ciliare porta ad una riduzione della clearance mucosale delle vie respiratorie. Una volta danneggiata la prima barriera difensiva non specifica del polmone, si verificano ulteriori replicazioni di *Mycoplasma hyopneumoniae* e la colonizzazione delle vie aeree. La perdita delle ciglia è prevalentemente limitata alle vie aeree dai lobi cranio-ventrali dei polmoni (apicale e cardiaco) e le principali lesioni macroscopiche della polmonite che si sviluppa in seguito sono riscontrabili in queste specifiche aree (Mebus e Underdahl, 1977). Inoltre, è stato dimostrato che *Mycoplasma hyopneumoniae* è in grado di modulare sia le risposte immunitarie innate che quelle adattive (Thacker, 2001), portando all'evasione delle difese dell'ospite e alla creazione di un'infezione cronica e persistente (Razin et al., 1998).

La patogenesi completa delle infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae* non è ancora del tutto chiarita, poiché non tutte le infezioni del tratto respiratorio con *Mycoplasma hyopneumoniae* portano a polmonite. Altri fattori, come la virulenza del ceppo coinvolto (Zielinski e Ross, 1990; Vicca et al., 2003; Meyns et al., 2007; Villarreal et al., 2009) e interazioni con altri patogeni respiratori (Ciprián et al., 1994; Opriessnig et al., 2011), possono giocare un ruolo decisivo nello sviluppo della malattia.

### Tipizzazione e diffusione di *Mycoplasma hyopneumoniae*

I Micoplasmici sono classificati tassonomicamente come membri della classe *Mollicutes*, un gruppo di batteri caratterizzato dalla mancanza di una parete cellulare. Le cellule di *Mycoplasma* sono per lo più sferiche e hanno una dimensione compresa tra 0,3 e 0,8  $\mu\text{m}$  (Razin, 2006). Hanno un piccolo genoma (893-920 coppie di kilobasi) (Dybvig e

Voelker, 1996), che codifica un numero limitato di geni e che porta quindi a ridotti processi biosintetici (Razin et al., 1998). A causa di questo metabolismo limitato, i micoplasmi devono ottenere metaboliti essenziali dall'ospite o dall'ambiente di crescita (Thacker and Minion, 2012).

*Mycoplasma hyopneumoniae* è presente in quasi tutti i paesi con una produzione intensiva di suini (Sibila et al., 2004, Fano et al., 2007; Meyns et al., 2007; Maes et al., 2008; Martínez et al., 2009; Fraile et al., 2010; Meyns et al., 2011; Fablet et al., 2012; Nathues et al., 2014; Maes et al., 2018) e all'interno degli allevamenti le infezioni possono verificarsi in tutte le fasi della produzione, quindi in animali da riproduzione, suinetti da latte e svezzati, nonché suini all'ingrasso.

La trasmissione di *Mycoplasma hyopneumoniae* può avvenire per vie diverse. La trasmissione tra allevamenti avviene principalmente con l'introduzione di animali infetti o per via aerea. Per quanto riguarda la trasmissione all'interno degli allevamenti, si possono avere contagi sia di tipo verticale (dalla scrofa alla prole), sia di tipo orizzontale (tra suini dello stesso box o da altri box).

La diagnosi di polmonite enzootica è generalmente eseguita a livello di gruppo piuttosto che a livello di singolo soggetto (Taylor, 2013; Thacker e Minion, 2012). La presenza di tosse nei suini da ingrasso combinata con lesioni croniche da broncopolmonite osservate al momento della macellazione, così come ridotti accrescimenti e la scarsa conversione dell'alimento durante il periodo di ingrasso possono portare a una diagnosi presunta di polmonite enzootica. Tuttavia, la diagnosi definitiva si basa sul rilevamento di *Mycoplasma hyopneumoniae* o di sue componenti. La diagnosi differenziale dovrebbe prendere in considerazione altre possibili cause di tosse, oltre a batteri e virus che causano lesioni da polmonite simili a quelle provocate da *Mycoplasma* (Sibila et al., 2009).

La valutazione della presenza di infezione all'interno dell'allevamento può avvenire mediante differenti metodi diagnostici. Sfortunatamente, le co-infezioni batteriche e virali sono abbastanza comuni nei moderni sistemi di allevamento e di conseguenza una diagnosi certa ed accurata può essere difficile e deve tenere conto anche dei fattori di rischio non infettivi che contribuiscono alla polmonite.

Nei casi di forme cliniche conclamate con la morte dei soggetti, dopo la valutazione necroscopica che evidenzia le lesioni anatomopatologiche classiche, i test di laboratorio

come la PCR confermano la diagnosi rilevando la presenza del patogeno nei tessuti analizzati.

In assenza di forme cliniche, sono disponibili due tipi di test diagnostici per tentare di rilevare la possibile colonizzazione da parte di questo batterio o una infezione in stadio precoce in suini asintomatici: PCR per rilevare l'acido nucleico e Test ELISA per la presenza di anticorpi specifici.

Al fine di ottenere risultati diagnostici certi ed evidenziare il maggior numero di soggetti positivi, le metodiche di prelievo in ordine di importanza sono le seguenti:

- lavaggio bronco-alveolare (BAL)
- spazzolamento delle vie aeree maggiori
- tamponi delle vie aeree maggiori
- tampone tracheale o aspirato tracheale
- raschiamenti delle tonsille
- tamponi nasofaringei profondi
- tamponi nasali.

Su tutti questi tipi di campioni vengono eseguiti i test PCR, in particolare la nested-PCR che viene considerata più sensibile rispetto alla RT-PCR e a tutti gli altri test.

Il principale fattore che limita la sensibilità del rilevamento in questi casi non è quindi il test utilizzato, ma il tipo, la qualità e la conservazione del campione. In generale, più il campione è stato ottenuto da secrezioni provenienti dall'area della biforcazione tracheale (a livello dell'ilo), maggiore è la probabilità di rilevamento di MH mediante PCR (Marois et al., 2007; Maes et al., 2018).

Molti suini infetti risultano però falsi negativi anche con l'utilizzo di test PCR, questo perché il patogeno non è presente all'interno del campione prelevato. Infatti, nella maggior parte dei soggetti asintomatici, *Mycoplasma hyopneumoniae* tende a colonizzare le ciglia delle medie e grandi vie aeree e non è presente nei fluidi orali o nelle secrezioni nasali in concentrazioni rilevabili. Per aumentare la probabilità di identificare i soggetti positivi per *Mycoplasma hyopneumoniae*, è consigliabile utilizzare lavaggi broncoalveolari (BAL) o raschiamenti con spazzole della mucosa a livello di ilo tracheale che permettono di ottenere campioni probabilmente migliori e diagnostici. Tuttavia questi tipi di campionamenti sono molto difficili da ottenere ante-mortem.

Per quanto riguarda l'isolamento colturale di *Mycoplasma hyopneumoniae*, purtroppo questo è particolarmente difficile da ottenere perché il patogeno è scarsamente resistente una volta prelevato dai campioni biologici da dove può essere isolato mediante gli altri test. Al momento l'unico modo per tentare di isolarlo e coltivarlo in laboratorio è il prelievo post-mortem dai tessuti polmonari infetti.

### **Resistenza**

I dati bibliografici ad oggi disponibili, riportanti valori di MIC recenti per questo patogeno, sono purtroppo abbastanza limitati per tutti i motivi fino ad ora elencati. In particolare, la scarsa possibilità di isolamento rende la valutazione delle MIC estremamente difficile.

Uno studio recente del MycoPath Study Group, c/o CEESA (Klein et al., 2017) riporta i dati collezionati in 3 Paesi europei (Belgio, Spagna e UK). I campioni sono stati prelevati post-mortem da suini tra i 3 e i 7 mesi di età, che presentavano segni clinici di patologia respiratoria, o da campioni di polmoni che al macello presentavano segni evidenti di polmonite enzootica e provenienti da allevamenti infetti. Tra i campioni prelevati, 50 isolati di *Mycoplasma* sono stati trasferiti ad un laboratorio centrale al fine di rendere i dati utili per il programma Europeo di Sorveglianza Antimicrobica MycoPath. I risultati ottenuti sono riportati nelle seguenti Tabelle 9 e 10.

## Capitolo 1 Informazioni Generali

Tabella 9 - Concentrazione minima inibente (MIC) di nove antibiotici nei confronti di isolati di *Mycoplasma hyopneumoniae*. Valori totali e valori per ognuno dei tre differenti paesi. Sono riportati anche i valori dei ceppi di controllo (Klein et al., 2017).

Country of Origin	MIC parameter	Result (mg/L)								
		Enrofloxacin	Marbofloxacin	Spiramycin	Tulathromycin	Tylosin	Tiamulin	Valnemulin	Florfenicol	Oxytetracycline
Belgium (16 isolates)	MIC Range	0.008-1	0.002-1	0.008-0.5	≤0.001-0.016	0.004-0.25	0.002-0.062	≤0.001-0.002	0.016-0.5	≤0.001-1
	MIC <sub>50</sub>	0.016	0.031	0.062	0.002	0.031	0.016	≤0.001	0.25	0.062
	MIC <sub>90</sub>	0.5	0.5	0.125	0.008	0.125	0.062	0.002	0.5	0.5
Spain (14 isolates)	MIC Range	0.016-0.5	0.016-0.5	0.016-0.125	≤0.001-0.004	0.008-0.031	0.004-0.031	≤0.001-0.002	0.031-0.5	0.016-0.25
	MIC <sub>50</sub>	0.031	0.125	0.031	≤0.001	0.016	0.016	≤0.001	0.25	0.062
	MIC <sub>90</sub>	0.5	0.5	0.062	0.004	0.031	0.016	≤0.001	0.5	0.125
United Kingdom (20 isolates)	MIC Range	0.008-1	0.016-1	0.008-0.5	≤0.001-0.016	0.008-0.5	0.008-0.125	≤0.001-0.002	0.016-1	≤0.001-2
	MIC <sub>50</sub>	0.031	0.031	0.062	≤0.001	0.031	0.031	≤0.001	0.5	0.031
	MIC <sub>90</sub>	1.0	1.0	0.25	0.004	0.25	0.062	≤0.001	1.0	0.25
All 50 isolates	MIC Range	0.008-1	0.002-1	0.008-0.5	≤0.001-0.016	0.004-0.5	0.002-0.125	≤0.001-0.002	0.016-1	≤0.001-2
	MIC <sub>50</sub>	0.031	0.031	0.062	≤0.001	0.031	0.016	≤0.001	0.25	0.062
	MIC <sub>90</sub>	0.5	0.5	0.25	0.004	0.125	0.062	≤0.001	0.5	0.25
Control NCTC 10110	MIC Range	0.016-0.031	0.031	0.062	≤0.001-0.002	0.016-0.031	0.008-0.031	≤0.001-0.002	0.5	0.125-0.25

Tabella 10 - Distribuzione delle MIC di nove antibiotici nei confronti di 50 isolati di *Mycoplasma hyopneumoniae* isolato da infezioni da *Mycoplasma* nei suini (Klein et al., 2017).

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)															MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)		
	≤0.001	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16			32	64
Enrofloxacin				3	20	11	1	1	5	5	4							0.03	0.5
Marbofloxacin		1			14	18		2	5	6	4							0.03	0.5
Spiramycin				5	4	9	17	9	4	2								0.06	0.25
Tulathromycin	26	8	12	1	3													≤0.001	0.002
Tylosin			1	6	13	17	7	2	3	1								0.03	0.12
Tiamulin		1	1	12	14	14	6	2										0.016	0.06
Valnemulin	46	4																≤0.001	≤0.001
Florfenicol					3	2	4	5	16	16	4							0.25	0.5
Oxytetracycline	2	1	3	3	8	6	8	7	9	1	1	1						0.06	0.25

Date le caratteristiche morfologiche di questo patogeno, cioè l'assenza di parete cellulare, gli antibiotici in grado di contrastarlo sono molto pochi. Tra questi, nella tabella sopra riportata, vi è anche la marbofloxacin. Come è evidente dai dati riportati, le MIC per la marbofloxacin attualmente disponibili non presentano alterazioni di rilievo rispetto a quanto fino ad oggi indicato in letteratura e nei medicinali veterinari autorizzati a base di marbofloxacin.

### Riferimenti bibliografici

- Blanchard B., Vena M.M., Cavalier A., Le Lannic J., Gouranton J., Kobisch M. (1992)** - "Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*" *Vet. Microbiol.*, 30, pg. 329-334
- Ciprián A., Cruz T.A., de la Garza M. (1994)** - "Mycoplasma hyopneumoniae: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens" – *Arch. Med. Res.*, 25, pg. 235-239
- Dybvig K. and Voelker L.L. (1996)** - "Molecular biology of Mycoplasmas" - *Annual Reviews Microbiology*, pg. 25–57
- Fablet C., Marois C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Jolly J.P., Le Devendec L., Kobisch M., Madec F., Rose N. (2012)** - "Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds" – *Res. Vet. Sci.*, 93, pg. 627-630
- Fano E., Pijoan C., Dee S., Deen J. (2007)** - "Effect of Mycoplasma hyopneumoniae colonization at weaning on disease severity in growing pigs" – *Can. J. Vet. Res.*, 71, pg. 195-200
- Fraille L., Alegre A., López-Jiménez R., Nofrarías M., Segalés J. (2010)** - "Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs" – *Vet. J.*, 184, pg. 326-333
- Klein U., de Jong A., Moyaert H., El Garch F., Leon R., Mazet A.R., Rosem., Maes D., Pridmore A., Thomson J.R., Ayling R.D. (2017)** - "Antimicrobial susceptibility monitoring of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma bovis isolated in Europe" – *Vet. Microbiol.*, 204, pg. 188-193
- Marois C., Le Carrou J., Kobisch M., Gautier-Bouchardon A.V. (2007)** - "Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets" – *Vet. Microbiol.*, 120, pg. 96-104
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F. (2008)** - "Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs" – *Vet. Microbiol.*, 126, pg. 297-309
- Maes D., Sibila M., Kuhnert P., Segales J., Haesebrouck F., Pieters M. (2018)** - "Update on Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control" - *Transbound .Emerg. Dis.*, 65, (Suppl. 1), 110-124
- Martínez J., Peris B., Gómez E.A., Corpa J.M. (2009)** - "The relationship between infectious and non-infectious herd factors with pneumonia at slaughter and productive parameters in fattening pigs" - *Vet. J.*, 179, pg. 240-246
- Mebus C.A., Underdahl N.R. (1977)** - "Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with Mycoplasma hyopneumoniae" – *A. J. Vet. Res.*, 38, pg. 1249-1254
- Meyns T., Maes D., Calus D., Ribbens S., Dewulf J., Chiers K., de Kruif A., Cox E., Decostere A., Haesebrouck, F. (2007)** - "Interactions of highly and low virulent Mycoplasma hyopneumoniae isolates with the respiratory tract of pigs" – *Vet. Microbiol.*, 120, pg. 87-95
- Meyns T., Van Steelant J., Rolly E., Dewulf J., Haesebrouck F., Maes D. (2011)** - "A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter" – *Vet. J.*, 187, pg. 388-392
- Nathues H., Chang Y.M., Wieland B., Rechter G., Spergser J., Rosengarten R., Kreienbrock L., Grosse Beilage E. (2014)** - "Herd-level risk factors for the seropositivity to Mycoplasma hyopneumoniae and the occurrence of Enzootic Pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density" -, *Transbound Emerg Dis.* 61(4), pg. 316-328

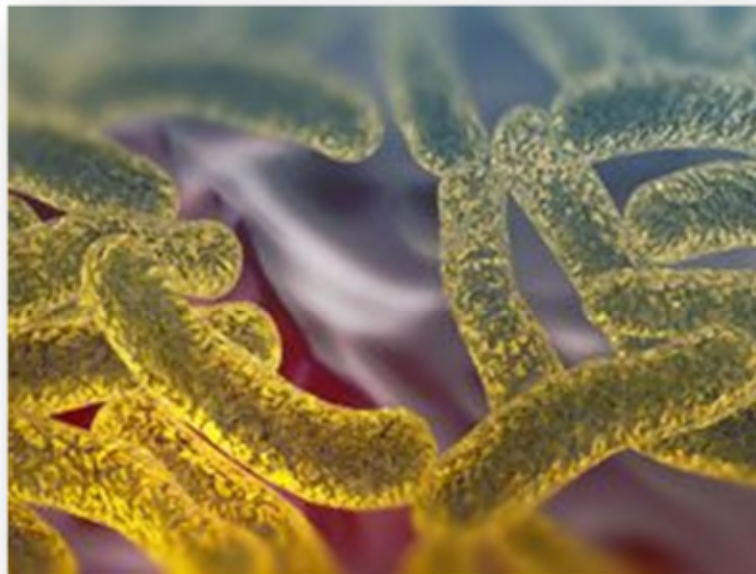
## Capitolo 1 Informazioni Generali

- Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G., Halbur P.G. (2011)** - "Polymicrobial respiratory disease in pigs" – *Ani. Health Res. Rev.*, 12, pg. 133-148
- Pijoan C. (2014)** *Mycoplasma hyopneumoniae*: fisiologia e dinâmica da imunidade. <https://www.3tres3.com.pt/artigos/mycoplasma-hyopneumoniae-fisiologia-e-dinamica-da-imunidade-7527/> (Settembre 2018)
- Razin S. (2006)** - "The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes)" - In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. and Stackebrandt E. (Eds.) - *The Prokaryotes*. New York, Springer, USA, pg. 836-904
- Razin S., Yogev D., Naot Y. (1998)** - "Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*" - *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, pg. 1094-1156
- Sibila M., Calsamiglia M., Vidal D., Badiella L., Aldaz A., Jensen J. C. (2004)** - "Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems" – *Can. J. of Vet. Res.*, 68, pg. 12-18
- Sibila M., Pieters M., Molitor T., Maes D., Haesebrouck F., Segalés J. (2009)** - "Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection" - *Vet. J.* 181, pg. 221-231
- Taylor D.J. (2013)** - "Bacterial diseases" - In: Taylor, D.J. (Ed.). *Pig diseases*. Glasgow, UK, pg. 188-198
- Thacker E.L. (2001)** - "Immunology of the porcine respiratory disease complex" – *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 17, pg. 551-565
- Thacker E.L., Minion F.C. (2012)** - "Mycoplasmosis" - In: Zimmerman J.J., Karike, L.A., Ramírez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (Eds.) - *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pg. 779-797
- Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P., Peeters J., de Krui, A., Haesebrouck F. (2003)** - "Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates" – *Vet. Microbiol.*, 97, pg. 177-190
- Villarreal I., Maes D., Meyn, T., Gebruers F., Calus D., Pasmans F., Haesebrouck F. (2009)** - "Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate" - *Vaccine*, 27, pg. 1875-1879
- Zielinski G.C., Ross R.F. (1990)** - "Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine" – *Am. J. Vet. Res.*, 51, pg. 344-348



### 1.3.3. *Pasteurella multocida*

*Pasteurella multocida* è l'agente eziologico causa di una vasta gamma di malattie di notevole impatto economico in tutto il mondo. Questo batterio rappresenta uno degli agenti più comunemente isolati dalle lesioni polmonari del suino (Falk et al., 1991; Høie et al., 1991; Choi et al., 2003; Sørensen et al., 2006) e nella rinite atrofica nei suini (Davies et al. 2003). Inoltre, questo organismo è tipicamente associato a forme di pleurite subacuta o cronica. La trasmissione è sia verticale che orizzontale, dove il contatto naso-a-naso rappresenta la forma più comune di contagio.



*Microscopia elettronica a scansione di Pasteurella multocida*  
(Pinterest.it Immagine on line)

### **Patogenesi della malattia**

*Pasteurella multocida* può essere un patogeno primario e secondario nelle malattie respiratorie in molte specie domestiche (Ewers et al., 2006). L'infezione è caratterizzata da una varietà di forme di setticemia, da lenta o latente a rapida evoluzione (Harper, 2006). Le infezioni umane sono, nella maggior parte dei casi, di origine animale e si verificano prevalentemente come conseguenza di morsi o graffi da parte di carnivori come cani o gatti (San Millan et al., 2009).



Uno studio preliminare nel suino ha dimostrato che, dopo inoculo intra-nasale di un isolato di campo di *Pasteurella multocida* di tipo A, si verificavano pleurite fibrinosa, pericardite e polmonite necroemorragica focali (lesioni associate anche a *A. pleuropneumoniae*) (João et al., 2015).

### Tipizzazione e diffusione

Sebbene questo batterio venga frequentemente isolato durante i test diagnostici di routine, sono disponibili pochi dati sulla sua epidemiologia, probabilmente a causa della sua complessità.

*Pasteurella multocida* appartiene alla famiglia delle *Pasteurellaceae*, che comprende altre specie associate alla polmonite e alla polisierosite nei suini, come *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis* (Vanalstine, 2012). Tipicamente, questo batterio è considerato un agente opportunista secondario della polmonite enzootica causata da *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pijoan e Fuentes, 1987; Hansen et al., 2010). In aggiunta al ruolo secondario nella broncopolmonite, *Pasteurella multocida* può causare pleurite, pericardite (Pijoan e Fuentes 1987; Ono et al., 2003; Pors et al. 2011) e polmonite necroemorragica, simile a quella causata da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Cappuccio et al., 2004).

*Pasteurella multocida* è abbastanza eterogenea; è stata infatti suddivisa in 5 sierogruppi capsulari (sierogruppi A, B, D, E ed F), ulteriormente classificati in 16 sierotipi (1-16), sulla base degli antigeni lipopolisaccaridici (Dziva et al., 2008; Tang et al., 2009). Ad oggi, solo i gruppi sierologici A, B e D sono stati riscontrati nei suini (Townsend et al., 1998; Davies et al., 2004). In generale, i ceppi che possiedono una capsula sono più virulenti delle loro varianti acapsulari (Boyce e Adler, 2000), inoltre è stata dimostrata un'associazione tra sierogruppi, ospiti e malattie specifiche. Ad esempio, i sierogruppi A ed F sono coinvolti nelle malattie respiratorie e nel colera dei volatili; i sierogruppi B ed F nella setticemia emorragica dei bovini mentre il sierogruppo D è solitamente isolato nella rinite atrofica nei suini (Backstrom et al., 1988; Ewers et al., 1988; Davies et al., 2003). Entrambi i ceppi (tossigenici e non tossigenici) dei sierogruppi A e D possono causare pasteurellosi pneumonica (Pijoan et al., 1983; Djordjevic et al., 1998), mentre gli isolati del sierogruppo B causano una setticemia emorragica e sono meno frequentemente associati ai suini

(Townsend et al., 1998; Dziva et al., 2008) La pasteurellosi è stata identificata come una delle più importanti zoonosi nel 1959 (Arashima e Kumasaka, 2005) e *Pasteurella multocida* è stata segnalata come la causa di una serie di epidemie, specialmente in Australia, Vietnam, Canada e Stati Uniti (Pijoan et al., 1983; Backstrom et al., 1988; Djordjevic et al., 1998; Townsend et al., 1998).

Saggi di tipizzazione capsulare basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) sono stati sviluppati per superare i problemi di caratterizzazione fenotipica, rendendo la tipizzazione capsulare accessibile nella diagnostica di routine (Townsend et al., 2001).

### Virulenza

Insieme al tipo capsulare, la patogenicità di *Pasteurella multocida* è anche associata a vari fattori di virulenza (VF), tra cui lipopolisaccaridi, fimbrie e adesine (ad esempio, emoagglutinina filamentosa, fimbria di tipo 4), tossine (tossina dermonecrotica), siderofori (es. proteine dell'acquisizione del ferro), sialidasi (che possono potenziare la virulenza batterica mediante smascheramento della chiave recettori ospiti e/o riduzione dell'efficacia delle difese dell'ospite) e proteine di membrana esterne (es. OmpA, OmpH, Oma87 e PlpB) (Harper et al., 2006; Tang et al., 2009).

Nell'ospite questi VF sono in grado di facilitare la colonizzazione, interferire con i meccanismi di difesa, indurre lesioni tissutali e/o la stimolare una risposta infiammatoria nociva (Hunt et al., 2000; Harper et al., 2006). Pertanto, la conoscenza dei VF è fondamentale per la prevenzione delle infezioni da *Pasteurella multocida* essendo questi importanti indicatori per definire il potenziale patogeno dei ceppi di *questo batterio*. Per questo motivo, la proteina legante l'emoglobina (hgbB), la proteina legante la transferrina (tbpA), l'emoagglutinina filamentosa (pfhA) e la tossina dermonecrotica (toxA) sono utilizzate per caratterizzare la virulenza dei ceppi di *Pasteurella multocida* (Ewers et al., 2006). Una correlazione tra VF e tipi capsulari è riportata in letteratura (Ewers et al., 2006). Il gene che codifica per pfhA è solitamente associato ai sierogruppi A, B, E e F. Il gene che codifica per tbpA si trova comunemente con i sierogruppi A e B, mentre il gene che codifica per il toxA è associato al sierogruppo D. Nessuna associazione distinta, tuttavia, è stata trovata tra il gene che codifica per hgbB e un tipo capsulare specifico (Ewers et al., 2006; Cucco et al., 2017).

## Capitolo 1 Informazioni Generali

Gli antigeni somatici sembrano essere di tipo lipopolisaccaridico e sono sufficientemente distinti da conferire solo una moderata protezione crociata contro altri sierotipi (Pijoan et al., 1983)

Poiché il comportamento patogeno è predetto sia dal tipo di VF che dal sierogruppo (Harper et al., 2006), le associazioni clonali di VF devono essere accuratamente valutate.

In Tabella 11 sono riportati i fattori di virulenza di *Pasteurella multocida* dei diversi tipi capsulari nelle varie specie di interesse zootecnico.

Tabella 11 - Presenza di varianti capsulari e fattori di virulenza in *Pasteurella multocida*. I dati sono suddivisi in base alla specie animale ed alla patologia (Cucco et al., 2017)

Animal species	Disease	Total	Capsular types					Virulence factors (VF)						
			A	B	D	E	F	hgbB	pfhA	tbpA	pfhA + tbpA	pfhA + hgbB	tbpA + toxA	No VFs
		39												
Cattle	Respiratory disease	36	36 (92.3)	0	0	0	0	2 (5.1)	1 (2.6)	2 (5.1)	31 (79.5)	0	0	0
	Others	3	3 (7.7)	0	0	0	0	2 (5.1)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
		40												0
Pig	Respiratory disease	40	32 (80.0)	0	8 (20.0)	0	0	24 (60.0)	15 (37.5)	0	0	1 (2.5)	0	0
		19												
Sheep	Respiratory disease	12	9 (47.4)	0	2 (10.5)	0	1 (5.3)	3 (15.8)	0	0	2 (10.5)	0	7 (36.8)	0
	Mastitis	5	5 (26.3)	0	0	0	0	1 (5.3)	0	0	0	0	4 (21.1)	0
	Septicaemia	2	2 (10.5)	0	0	0	0	2 (10.5)	0	0	0	0	0	0
	Others	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		88												
Rabbit	Respiratory disease	31	20 (22.7)	0	5 (5.7)	0	6 (6.8)	15 (17.0)	13 (14.8)	0	0	3 (3.4)	0	0
	Mastitis	9	8 (9.1)	0	1 (1.1)	0	0	4 (4.5)	1 (1.1)	0	0	2 (2.3)	0	2 (2.3)
	Septicaemia	22	10 (11.4)	1 (1.1)	4 (4.5)	0	7 (7.9)	7 (7.9)	12 (13.6)	0	1 (1.1)	2 (2.3)	0	0
	Reproductive disease	12	8 (9.1)	0	2 (2.3)	0	2 (2.3)	10 (11.4)	2 (2.3)	0	0	0	0	0
	Others	14	5 (5.7)	0	2 (2.3)	0	7 (7.9)	7 (7.9)	6 (6.8)	0	0	0	0	1 (1.1)
<b>Total</b>		<b>186</b>	<b>138 (74.2)</b>	<b>1 (0.5)</b>	<b>24 (12.9)</b>	<b>0</b>	<b>23 (12.4)</b>	<b>77 (41.4)</b>	<b>50 (26.9)</b>	<b>2 (1.1)</b>	<b>35 (18.8)</b>	<b>8 (4.3)</b>	<b>11 (5.9)</b>	<b>3 (1.6)</b>

hgbB = haemoglobin binding protein; pfhA = filamentous haemagglutinin; tbpA = transferrin binding protein; toxA = dermonecrotic toxin.

**Resistenza**

Il controllo della pasteurellosi si basa principalmente sulla terapia antimicrobica (Sellyei et al., 2009). Tuttavia l'insorgenza di ceppi resistenti è stata segnalata recentemente in suini, pollame e bovini (San Millan et al., 2009; Tang et al., 2009; Michael et al., 2012). Questa scoperta ha sollevato preoccupazioni, poiché la resistenza agli antibiotici nei batteri patogeni, riscontrati negli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, è riconosciuta come una questione emergente.

Nonostante l'importanza di questa infezione, vi è una mancanza di informazioni sulle caratteristiche degli isolati di *Pasteurella multocida* nei focolai riscontrati negli animali. Si ritiene che la sua trasmissione interspecifica si verifichi in determinate condizioni (Tang et al., 2009).

In Cina è stata svolta una indagine sulla prevalenza di *Pasteurella multocida* in campioni di animali con sintomatologia clinica raccolti in 16 province tra il 2003 e il 2007 (Tabella 12). Per ottenere maggiori informazioni sull'epidemiologia dell'infezione da *Pasteurella multocida* suina e per caratterizzare gli isolati clinici, sono stati studiati un totale di 233 isolati di *Pasteurella multocida* associati alla malattia clinica in questa specie per le distribuzioni dei sierogruppi capsulari, i profili fenotipici di resistenza antimicrobica e la presenza di 19 geni di virulenza (Tang et al., 2009).

*Tabella 12 - MIC di 20 agenti antibatterici nei confronti di 233 ceppi di Pasteurella multocida (Tang et al., 2009).*

Antimicrobial <sup>a</sup>	No. of isolates with MIC of (µg/ml):																Breakpoint MIC (µg/ml) <sup>b</sup>	MIC <sub>50</sub> (µg/ml)	MIC <sub>90</sub> (µg/ml)	% Resistance <sup>c</sup>	
	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1,024					
AMX						4	1	2	1	38	49	62	54	12	7	3	32	64	128	80.3	
FAM	1	1	8	101	96	18	6	1	1								32	0.5	0.5	0	
XLN	165	58	6	1	3												8	≤0.03	0.06	0	
SPT									14	36	71	84	15	7	4	2	128	32	128	12.0	
KAN						17	34	66	58	21	7	18	10	2			64	4	64	12.8	
NEO						14	18	62	48	45	26	9	11				ND <sup>c</sup>	8	32	ND	
GEN				2	11	30	62	56	40	23	7	2					16	4	16	13.7	
AMK						2	2	23	76	49	48	17	14	2			64	16	64	14.2	
CHL			13	99	85	12	9	3	2	4	5	1					32	0.5	2	2.6	
FFC		8	48	107	54	9	3	4									8	0.25	0.5	0	
ERY			16	39	18	36	54	56	12	1		1					8	2	4	6.0	
TYL			2	19	17	10	33	36	28	22	24	17	12	9	4		32	4	128	28.3	
LIN						1	7	22	102	71	25	5					4	8	32	96.6	
CLI					1	1	12	32	61	61	42	18	5				4	4	16	80.3	
CTET						5	14	28	34	36	34	33	25	20	2	2	16	16	128	65.2	
TET						1	13	25	41	18	22	36	32	27	8	10	16	16	128	58.0	
CIP	91	84	31	22	3	1	1										4	0.06	0.25	0	
SDM											2	9	12	11	67	132	512	≥1,024	≥1,024	85.4	
SXT										1	2	5	7	24	21	43	130	512	≥1,024	≥1,024	74.2
PB	2	5	12	26	39	51	37	39	16	3	3						ND	1	4	ND	

<sup>a</sup> AMX, amoxicillin; FAM, cefazolin; XLN, ceftiofur; SPT, spectinomycin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CHL, chloramphenicol; FFC, florfenicol; ERY, erythromycin; TYL, tilmicosin; LIN, lincomycin; CLI, clindamycin; CTET, chlortetracycline; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; SDM, sulfamethazine; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; PB, polymyxin B.  
<sup>b</sup> The values, with the exception of those for ciprofloxacin, are based on CLSI standards.  
<sup>c</sup> ND, not determined.

## Capitolo 1 Informazioni Generali

I risultati ottenuti hanno confermato un'alta incidenza di ceppi di *Pasteurella multocida* negli allevamenti di suini. Inoltre è emerso che le infezioni causate da ceppi di *Pasteurella multocida* erano causate principalmente dal sierogruppo D, rispetto al sierogruppo A. Risultati simili sono stati riportati da Ewers et al. (2006) in Germania (58,1% vs 34,9%). Al contrario, in altri studi svolti negli Stati Uniti (Pijoan et al., 1983) e in Inghilterra e Galles (Davies et al., 2003), la prevalenza di ceppi di sierogruppo capsulare D è inferiore

a quella del sierogruppo A.

*Tabella 13 - Valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> e range (mg/L) per diversi antimicrobici nei confronti di diversi ceppi di P. multocida isolati in allevamenti suini in 8 Paesi EU-(Estratto Klein et al., 2015).*

	Pm (n=152)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC Range
Amoxicillin	0.25	0.5	0.12-≥128
Amoxicillin/ clavulanic acid	0.25	0.5	0.12-1
Apramycin	-	-	-
Cefquinome	0.03	0.06	0.008-0.5
Ceftiofur	0.004	0.004	≤0.002-0.06
Colistin	-	-	-
Danofloxacin	0.03	0.06	0.008-0.5
Enrofloxacin	0.03	0.06	0.008-0.25
<b>Marbofloxacin</b>	0.03	0.06	0.015-0.5
Florfenicol	0.5	0.5	0.25-≥32
Gentamicin	-	-	-
Lincomycin	32	>32	≤4-≥64
Neomycin	-	-	-
Spectinomycin	32	32	16-≥512
Streptomycin	-	-	-
Tetracycline	0.5	2	0.12-≥128
Tiamulin	32	64	4-≥128
Tilmicosin	8	16	1-32
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0.06	0.5	0.03-≥32
Tulathromycin	2	4	1-8
Tylosin	32	64	8-≥128

-: not tested

Uno studio recente, pubblicato dal VetPath Study Group del CEESA (Klein et al., 2015), riporta i dati riferiti ad alcuni patogeni, tra cui *Pasteurella multocida*, isolati nel tratto respiratori, enterico e meningi del suino, collezionati in 8 diversi Paesi EU (Belgio, Danimarca Francia, Germania, Olanda Polonia, Spagna e UK) dal 2009-2012.

I campioni sono stati prelevati da animali con sintomatologia acuta, non trattati con antibiotici nei 15 giorni precedenti il campionamento. Le MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> sono state determinate per vari antibiotici tra cui anche marbofloxacin (Tabella 13).

Analogo piano di sorveglianza è stato effettuato sempre dal VetPath Study Group del CEESA raccogliendo ceppi di patogeni da animali malati (bovini, suini e volatili) provenienti da 11 Paesi EU (de Jong, et al., 2014) nel periodo compreso dal 2002 al 2006.



Tabella 14 - Valori di MIC e suscettibilità di alcuni ceppi di *Pasteurella multocida* in 11 paesi Europei isolati in suino dal 2002 al 2006 (de Jong et al., 2014).

Antimicrobial Agent	<i>P. multocida</i> (n = 230)																	Kruskal-Wallis test		Dunn test						
	MIC values (µg/mL)																	df	p-value							
	0.002	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128				256	512	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	S (%)	I (%)
Amoxicillin						1	37	180	8	1											0.25	0.25	-	-	-	ns
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>a</sup>										54	175	1									0.25	0.25	100.0	0.0	0.0	ns
Cefquinome												2	1	1							0.03	0.03	-	-	-	ns
Ceftiofur	121	60	12	17	7	11						2									<0.002	0.015	100.0	0.0	0.0	ns
Cephalexin													38	167	24	1					2	4	-	-	-	ns
Danofloxacin																					0.015	0.03	-	-	-	ns
Enrofloxacin																					0.008	0.03	100.0	0.0	0.0	ns
Marbofloxacin																					0.03	0.06	-	-	-	<0.01
Florensidol																					0.5	0.5	99.6	0.4	0.0	ns
Doxycycline <sup>b</sup>																					0.25	1	-	-	-	<0.01
Tetracycline <sup>b</sup>																					0.5	2	57.0	20.8	22.2	<0.02
Tiamulin																					16	32	-	-	-	<0.05
Tilmicosin																					4	16	99.1	-	0.9	<0.01
Tylosin																					32	32	-	-	-	<0.01
Lincomycin																					≥32	≥32	-	-	-	<0.01
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>c</sup>																					0.06	0.5	91.7	4.8	3.5	<0.01
Spectinomycin																					32	32	-	-	-	ns

Per il suino sono stati isolati un totale di 230 ceppi di *Pasteurella Multocida* recuperati da infezioni respiratorie dei suini. I valori di MIC per i tre fluorochinoloni testati (danofloxacin, enrofloxacin e marbofloxacin) sono stati distribuiti in modo simile, sebbene siano evidenti piccole differenze di suscettibilità (Tabella 14).

Come si evince dal confronto dei dati presenti nelle due tabelle (Tabella 13 e 14) per marbofloxacin i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> per *Pasteurella multocida* sono rimasti invariati (0,03 e 0,006 µg/ml) in tutto il periodo di studio dal 2002 al 2012.

### Riferimenti bibliografici

**Arashima Y. e Kumasaka K. (2005)** - "Pasteurellosis as zoonosis" - Intern. Med., 44, pg. 692–693

**Backstrom L. R., T. A. Brim, M. T. Collin. (1988)** - "Development of turbinate lesions and nasal colonization of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida during long term exposure of healthy pigs affected by atrophic rhinitis" - Can. J. Vet. Res. 52, pg. 23–29

**Boyce J.D., Adler B. (2000)** - "The Capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of Pasteurella multocida M1404 (B:2)" - Infect. and Immun., 68, pg. 3463-3468

**Cappuccio J., Leotta G.A., Vigo G., Moredo F., Wolcott M.J. & Perfumo C.J. (2004)** - "Phenotypic characterization of Pasteurella multocida strains isolated from pigs with bronco and pleuropneumonia" - 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany, pg. 205

**Choi Y.K., Goyal S.M. & Joo H.S. (2003)** - "Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs" - Can. J. Vet. Res., 44, pg. 735-737

**Cucco L., Massacci F.R., Sebastiani C., Mangili P., Bano L., Cocchi M., Luppi A., Ortenzi R., Pezzotti G. and Magistrali C.F. (2017)** - "Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of Pasteurella multocida strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy" - Vet. Ital., 53 (1), pg. 21-27

**Davies R.L., Mac Corquodale R., Baillie S. & Caffrey B. (2003)** - "Characterization and comparison of Pasteurella multocida strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis" - J. Med. Microbiol., 52, (Pt 1), pg. 59-67

**Davies R. L., MacCorquodale R., and Reilly S. (2004)** - "Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin" - Vet. Microbiol. 99, pg. 145–158

**de Jong A. , Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I. ButtyP., Klein U., Marion H., Rigaut D., Valle M. (2014)** - "Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study" – Vet. Microbiol., 172, pg. 202–215

**Djordjevic S. P., Eamens G.J., Ha H., Walker M. J. and Chin J. C. (1998)** - "Demonstration that Australian Pasteurella multocida isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (toxA<sub>-</sub>) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis" - J. Med. Microbiol., 47, pg. 679–688

**Dziva F., Muhairwa A. P., Bisgaard M. and Christensen H. (2008)** - "Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with Pasteurella multocida" - Vet. Microbiol., 128, pg. 1–22

**Ewers C., Lu**¨**bke-Becker A., Bethe A., Kiebling Backstrom S.L.R., Brim T. A. and Collins M.T. (1988)** - "Development of turbinate lesions and nasal colonization of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida during long term exposure of healthy pigs affected by atrophic rhinitis" - Can. J. Vet. Res. 52, pg. 23–29

**Ewers C., Lu**¨**bke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M., Wieler L.H. (2006)** - "Virulence genotype of Pasteurella multocida strains isolated from different hosts with various disease status" - Vet. Microbiol., 114, pg. 304–317

**Falk K., Høie S. & Lium B.M. (1991)** - "An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology" - Acta Vet. Scand., 32, pg. 67-77

- Hansen M.S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M. & Nielsen O.L. (2010)** - "An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark" - *J. Comp. Pathol.*, 143, pg. 120-131
- Harper M., Boyce J.D. & Adler B. (2006)** - "Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS" - *Microbiol Lett*, 265, pg. 1-10
- Høie S., Falk K. & Lium B.M. (1991)** - "An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions" - *Acta Vet. Scand.*, 32, pg. 395- 402
- Hunt M. L., Adler B, and Townsend K.M. (2000)** - "The molecular biology of Pasteurella multocida" - *Vet. Microbiol.*, 72, pg. 3–25
- João X., de Oliveira F., Marcos A.Z., Rebelatto M.R., Alais M.D., Agnol Camila L.A. Plieski, Klein C.S., Barcellos D.E.S.N., Morés N. (2015)** - "Pasteurella multocida type A as the primary agent of pneumonia and septicaemia in pigs" - *Pesq. Vet. Bras.*, 35, (8), pg. 716-724
- Klein U., Homas V., De Jong A., Simjee S., Moyaert H., Siegwart E., EL Garch F., Butty P., Marion H., Rigaut D., Haag SDiergarten S., Richard-Mazet A. (2015)** - "Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012" - *VethPat Poster*
- Michael G.B., Kadlec K., Sweeney M.T., Brzuszkiewicz E., Liesegang H., Daniel R., Murray R.W., Watts J.L. & Schwarz S. (2012)** - "ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of Pasteurella multocida: analysis of regions that comprise 12 antimicrobial resistance genes" - *J. Antimicrob. Chemother*, 67, pg. 84-90
- Ono M., Okada M., Namimatsu T., Fujii S., Mukai T. & Sakano T. (2003)** - "Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with Pasteurella multocida capsular serotype A." - *J. Comp. Pathol.*, 129, pg.251-258
- Pijoan C. & Fuentes M. (1987)** - "Severe pleuritis associated with certain strains of Pasteurella multocida in swine" - *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191, pg. 823-826
- Pijoan C., Morrison R B., Hilley H.D. (1983)** - "Serotyping of Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter" - *J. Clin. Microbiol.*, 17, pg. 1074–1076
- Pors S.E., Hansen M.S., Bisgaard M. & Jensen H.E. (2011)** - "Occurrence and associated lesions of Pasteurella multocida in porcine bronchopneumonia" - *Vet. Microbiol.*, 150, pg. 160-166
- San Millan A., Escudero J.A., Gutierrez B., Hidalgo L., Garcia N., Llagostera M., Dominguez L. & Gonzalez-Zorn B. (2009)** - "Multiresistance in Pasteurella multocida is mediated by coexistence of small plasmids" - *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, pg. 3399-3404
- Sellyei B., Varga Z., Szentesi-Samu K., Kaszanyttzky M. & Magyar T. (2009)** - "Antimicrobial susceptibility of Pasteurella multocida isolated from swine and poultry " - *Acta Vet. Hung.*, 57, pg. 357-367
- Sørensen V., Jorsal S.E. & Mousing J. (2006)** - "Diseases of the respiratory system" - In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allarie S. & Taylor D.J. (Eds), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford, pg .149-177
- Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q. & Chen H. (2009)** - "Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of Pasteurella multocida strains from swine in China" - *J. Clin. Microbiol.*, 47, pg. 951-958
- Townsend K. M., Boyce J.D., Chung J.J., Frost A.J. & Adler B. (2001)** - "Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system" - *J. Clin. Microbiol.*, 39, pg. 924-929



## *Capitolo 1 Informazioni Generali*

**Townsend K. M., O'Boyl D. T. T. Phan, T. X. Hanh, T. G. Wijewardana, I. Wilkie, N. T. Trung, and A. J. Frost (1998)** - "Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs" - *Vet. Microbiol.*, 63, pg. 205–215

**Vanalstine W.G. (2012)** - "Respiratory System" - In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pg. 348-362

## 1.4. Effetto post antibiotico e correlazione PK/PD

Per valutare l'efficacia di un agente antimicrobico è importante considerare l'effetto post-antibiotico (PAE), caratteristica esclusiva di antibiotici che si legano ai batteri oppure alle strutture intracellulari, come nel caso di marbofloxacina, e la correlazione dei parametri di farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD).

In generale, la valutazione *in vitro* della PD può sottostimare l'attività che un antimicrobico può raggiungere *in vivo*, soprattutto a causa dell'effetto post antibiotico (definito come la differenza tra il tempo necessario per far crescere di 10 volte una popolazione batterica esposta all'antibiotico ed il tempo necessario per far crescere nella stessa proporzione una popolazione batterica di controllo) e dell'aumento post antimicrobico dei leucociti (PALE), ovvero la maggiore suscettibilità all'azione leucocitaria dimostrata dai batteri a seguito dell'esposizione ad un antimicrobico.

I farmaci che producono un PAE elevato tendono a provocare anche un alto PALE. L'entità di PAE dipende dal patogeno presente, dal tipo di farmaco impiegato, dalla concentrazione di farmaco a cui il microorganismo viene esposto e dalla durata dell'esposizione stessa; generalmente il PAE è più lungo *in vivo* che *in vitro*. Ad esempio, la maggior parte degli antibatterici efficaci contro i Gram-positivi (es. Stafilococchi e Streptococchi) e quelli inibitori della sintesi proteica e degli acidi nucleici dei Gram-negativi hanno un PAE da moderato a prolungato; viceversa, i  $\beta$ -lattamici hanno un PAE scarso o nullo nei confronti della maggior parte dei Gram-negativi.

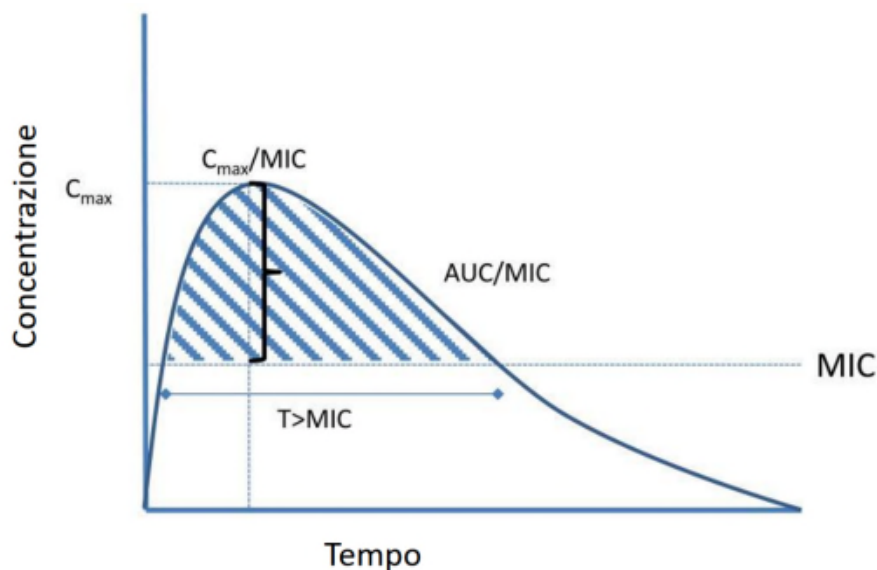
Pertanto la durata del PAE corrisponde alla durata dell'inibizione della crescita batterica dopo la scomparsa dell'antibiotico. La durata dell'effetto post-antibiotico dipende dal tempo di contatto antibiotico/batteri e dalla concentrazione dell'antibiotico durante la fase d'impregnazione; più lunga è questa fase e più elevata è la concentrazione dell'antibiotico, più il PAE sarà prolungato. Lees e Aliabadi (2002) hanno riferito che la marbofloxacina esercita un effetto post-antibiotico prolungato.

Il PAE ha un importante significato clinico in quanto, assieme agli altri parametri di PD, potrebbe essere usato per consentire la formulazione di nuovi dosaggi antimicrobici più vicini alle reali necessità terapeutiche. Nel suddetto contesto, aumentare l'intervallo tra le dosi, in un farmaco antimicrobico che ha un alto PAE, può portare a diversi vantaggi,

tra cui una minore tossicità, una maggiore facilità nel rispettare la posologia dovuta al ridotto numero di somministrazioni da effettuare e, non da ultimo, una possibile riduzione dei costi.

I principali parametri cinetici che si correlano all'attività batterica sono la concentrazione ematica massima ( $C_{max}$ ), l'emivita del farmaco ( $T_{1/2}$ ) e l'area sotto la curva (AUC) (Figura 5).

Figura 5 - Parametri che influenzano l'attività batterica (EHC Program, 2013).



Gli antimicrobici possono essere suddivisi in tre gruppi sulla base dei parametri che meglio ne predicono l'efficacia clinica:

- Antimicrobici concentrazione-dipendenti
- Antimicrobici tempo-dipendenti
- Antimicrobici co-dipendenti (concentrazione- e tempo-dipendenti)

All'interno di ogni classe antibiotica vi possono essere molecole appartenenti a gruppi diversi.

La farmacocinetica (PK) e la farmacodinamica (PD) sono due delle aree principali della farmacologia. Per ottenere l'azione terapeutica di un antimicrobico sono importanti sia la farmacodinamica sia la farmacocinetica, infatti l'intensità dell'effetto antimicrobico è in stretta relazione con le concentrazioni dell'antimicrobico nella sede di azione (PK) e con i valori di MIC nei confronti di specifici batteri (PD); va considerato che la MIC viene

determinata attraverso studi in vitro, e non in vivo, cioè nell'ambiente reale in cui si troverà a crescere il batterio.

La tabella seguente classifica gli antimicrobici in base ai parametri PK/PD evidenziando il loro obiettivo farmacologico.

Tabella 15 - Classificazione degli antimicrobici in base ai parametri PK/PD.

Gruppo	PK/PD	Obiettivo farmacologico	Esempi
<b>Concentrazione-dipendenti</b>	<b><math>C_{max}/MIC</math></b> L'effetto maggiore si evidenzia quando le concentrazioni dell'antimicrobico sono più alte rispetto alla concentrazione minima inibente del microorganismo patogeno	Massimizzare le concentrazioni di antimicrobico*	Amminoglicosidi, Colistina, Fluorochinoloni, Metronidazolo, Rifamicine
<b>Tempo-dipendenti</b>	<b><math>T &gt; MIC</math></b> L'effetto clinico è determinato dal tempo durante il quale la concentrazione dell'antimicrobico eccede la MIC nel sito di infezione	Massimizzare il periodo in cui la concentrazione dell'antimicrobico è maggiore della MIC $\cong$ rispettare intervalli di somministrazione*	Cefalosporine, Clindamicina, Macrolidi (eccetto azitromicina), Penicilline, Tetracicine, Trimetoprim, Vancomicina
<b>Co-dipendenti</b>	<b><math>AUC/MIC</math></b> L'efficacia dell'antimicrobico è determinato dalla sua concentrazione nell'area che sottende la curva in relazione alla MIC	Massimizzare la concentrazione di antimicrobico nel tempo*	Azitromicina, Beta-lattamici (in relazione alla riduzione delle pressioni selettive sulle resistenze), Fluorochinoloni (alcuni di quelli con attività anaerobica)

*$C_{max}$  = concentrazione massima; MIC = minima concentrazione inibente; T = tempo; AUC = area sottesa alla curva (\*sempre nel rispetto di quanto previsto da AIC del medicinale)*

Negli ultimi due decenni, ci sono stati importanti progressi nella progettazione degli schemi di dosaggio dei farmaci antimicrobici, basati sull'integrazione e la modellazione di dati farmacodinamici (PD) e farmacocinetici (PK) (McKellar et al., 2004). Questi approcci hanno fornito nuove strategie per prevedere i dosaggi dei farmaci che ottimizzano l'efficacia e minimizzano le opportunità per l'insorgere e la successiva diffusione della resistenza (Potter et al., 2013; Vilalta et al., 2014; Toutain et al., 2017). L'ottimizzazione del dosaggio può comportare la riduzione delle dosi che potrebbero risultare troppo elevate,

l'aumento delle dosi quando si dimostrino troppo basse, oppure, in altri casi, si può agire sulla durata del trattamento.

L'uso della correlazione PK/PD è ormai riconosciuto come un mezzo estremamente versatile e significativo per una scelta razionale e corretta della dose e della frequenza di somministrazione di un antibiotico. I dati pubblicati evidenziano come i risultati degli studi clinici non siano sufficientemente indicativi e sensibili da consentire di determinare il regime posologico ideale per ottenere la guarigione batteriologica.

La valenza e l'attendibilità dei dati ottenuti dalla correlazione tra parametri farmacocinetici e farmacodinamici è stata confermata anche a posteriori sulla base dei risultati di studi clinici sia in medicina umana sia in veterinaria.

I FLQ, e quindi marbofloxacin, sono considerati degli antibatterici concentrazione dipendenti, ossia l'aumento delle loro concentrazioni nei siti infetti ne incrementa l'efficacia. Molti Autori sottolineano che il loro successo terapeutico è correlato sia al rapporto tra l'area sotto la curva e la concentrazione inibitoria minima (AUC/MIC), sia al rapporto tra concentrazione massima e MIC ( $C_{max}/MIC$ ) (Levison e Levison, 2009; Nielsen et al., 2011; Martinez et al., 2012; Potter et al., 2013; Vilalta et al., 2014; Lees et al., 2015).

Quindi, è di massima importanza ottimizzare la quantità di farmaco somministrata e la concentrazione picco in rapporto al valore di MIC. Molti Autori considerano efficaci il rapporto di  $AUC/MIC \geq 100-125$  (Gram negativi e micoplasmi),  $AUC/MIC \geq 30-50$  (Gram positivi) e  $C_{max}/MIC \geq 8-10$  (Toutain, 2003; Burch, 2012; Lees et al., 2008; Martinez et al., 2012; Papich, 2014; Vilalta et al., 2014).

Nel caso di somministrazioni singole o per quei principi attivi che non richiedono uno *steady state* ottenibile con più somministrazioni, si utilizza l' $AUC_{0-24ore}$ . Per quanto riguarda le MIC è preferibile correlare dati ottenuti sperimentalmente o, in caso di MIC bibliografiche, utilizzare le  $MIC_{90}$ .

### Riferimenti bibliografici

**Burch D.G.S. (2012)** - "Examination of the pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) relationship of orally administered antimicrobials and their correlation with the therapy of various bacterial and mycoplasmal infections in pigs" - Thesis Royal college of veterinary Surgeons London, pg. 1-144

**EHC Program (2013)** - Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Measures for Guiding Antibiotic Treatment for Nosocomial Pneumonia. Evidence-based Practice Center Systematic Review Protocol.  
<https://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/ehc/products/522/1598/pneumonia-antibiotic-treatment-protocol-130718.pdf> (giugno 2017)

**Lees P., Aliabadi F.S. (2002)** - "Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans" - Int. J. Antimicrob. Agents, 19, (4), pg. 269–284

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

**Lees P., Pelligand L., Illambas J., Potter T., Lacroix M., Rycroft A., et al. (2015)** - "Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of amoxicillin for the calf pathogens *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 38, (5), pg. 457–470

**Levison M.E., Levison J.H. (2009)** - "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents" - Infect. Dis. Clin. N. Am., 23, (4), pg. 791–815

**Martinez M.N., Papich M.G., Drusano G.L. (2012)** - "Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target" - Antimicrob Agents Chemother., 56, (6), pg. 2795–2805

**McKellar Q.A. Sanchez Bruni S.F., Jones D.G. (2004)** - "Pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationship of antimicrobial drugs used in veterinary medicine" - J. Vet. Pharmacol. Therap., 27, pg. 503-514

**Nielsen E.I., Cars O., Friberg L.E. (2011)** - "Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization" - Antimicrob Agents Chemother., 55, (10), pg. 4619–4630

**Papich M. (2014)** - "Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage for the prudent use of antimicrobial drugs" - Veterinary Microbiology, 171, pg. 480-486

**Potter T., Illambas J., Pelligand L., Rycroft A., Lees P. (2013)** - "Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*" - Vet. J., 195, pg. 53–58

**Toutain P.L. (2003)** - "Pharmacokinetics / pharmacodynamics integration in dosage regimen optimization for veterinary medicine" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 26, (Supplement 1), pg. 1-8

**Toutain P.L., Potter T., Pelligand L., Lacroix M., Illambas J., Lees P. (2017)** - "Standard PK/ PD concepts can be applied to determine a dosage regimen for a macrolide: the case of tulathromycin in the calf" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 40, (1), pg. 16–27

**Vetoquinol (1997)** - "Marbocyl Marbofloxacin" - Reference book, pg. 1-104

**Vilalta C., Giboin H., Schneider M., El Garch F., Fraile L. (2014)** - "Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of marbofloxacin in the treatment of *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in nursery and fattener pigs using Monte Carlo simulations" - J. Vet. Pharmacol. Ther., 37, (6), pg. 542–549

## *Capitolo 2*

# *Scopo della Ricerca*



## SCOPO DELLA RICERCA

La terapia antibiotica dovrebbe portare non solo alla guarigione clinica, ma dovrebbe consentire anche la guarigione batteriologica, cioè l'eliminazione del patogeno così da limitare anche la possibile insorgenza di resistenze.

Negli ultimi anni la sempre maggiore sensibilità degli Organismi mondiali di controllo della Salute pubblica ha identificato la marbofloxacinina tra le sostanze per le quali si richiede un uso prudente e limitato a casi di reale necessità, per evitare insorgenza di antibiotico resistenza.

Le raccomandazioni richiedono anche di rivedere gli schemi posologici al fine di identificare dosaggi terapeutici efficaci e che minimizzino le possibili insorgenze e successive diffusioni di fenomeni di farmacoresistenza. Dosaggi bassi o inferiori ai valori di MIC dei patogeni target possono determinare insorgenza di ceppi batterici resistenti.

Marbofloxacinina è tra le sostanze antimicrobiche di maggior impiego in medicina veterinaria, utilizzata soprattutto nel suino per il trattamento delle patologie respiratorie sostenute da germi sensibili e in particolare *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida* alla più tradizionale posologia intramuscolare di 2 mg/kg p.v. una volta al giorno per 3-5 giorni.

Scopo di questo studio è quello di individuare, sulla base del comportamento dose dipendente di marbofloxacinina, una nuova posologia one-shot che risulti efficace per il suino ma anche sicura per l'uomo e per l'ambiente, allo scopo di minimizzare l'insorgenza e diffusione di fenomeni resistenza.

Gli obiettivi specifici sono stati quelli di:

- studiare nel suino il comportamento cinetico di diversi dosaggi one-shot di marbofloxacinina;
- valutare la sensibilità antimicrobica a marbofloxacinina dei tre principali patogeni respiratori target del suino (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*) rispetto ai dati bibliografici a disposizione;
- individuare mediante la correlazione dei principali parametri sperimentali farmacocinetici e farmacodinamici un nuovo possibile schema posologico;
- confermare l'efficacia clinica della nuova posologia;
- testare i margini di sicurezza per la specie target, l'uomo e l'ambiente.

*Capitolo 3*

# *Studi Sperimentali*

## 3.1. PROFILO FARMACOLOGICO

### 3.1.1. Farmacocinetica

Per definire la dose efficace di una posologia one-shot è stato condotto innanzitutto uno studio di cinetica nel suino. Sono stati somministrati tre diversi dosaggi di marbofloxacin (6, 8 e 10 mg/kg p.v.) in singola somministrazione intramuscolare one-shot.

Per lo studio è stato utilizzato il medicinale veterinario Masterflox 10 (Fatro S.p.A) soluzione iniettabile a base di marbofloxacin al 10% regolarmente autorizzato ed in commercio in Italia.

La prova è stata condotta in conformità alle norme GLP ed in accordo con le Direttive Europee sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici (Direttiva 86/609/EEC recepita in Italia da D. Lgs. 116/92; Direttiva 2010/63/EU recepita in Italia dal D. Lgs. 26/2014), e autorizzata dal Ministero della Salute italiano.

- [Animali](#)

Per la prova sono stati arruolati 18 suini ibridi commerciali, di circa 5 mesi di età e peso compreso tra i 52,5 ed i 70,0 kg, clinicamente sani. Tutti gli animali sono stati identificati tramite marca auricolare e suddivisi in tre gruppi sperimentali (A, B, C) di 6 suini ciascuno, omogenei per età, peso e sesso.

- [Trattamento](#)

Il giorno precedente il trattamento farmacologico i suini sono stati pesati per calcolare l'esatta dose individuale di marbofloxacin da somministrare. Gli animali sono stati trattati secondo un disegno sperimentale in parallelo.

Ogni suino ha ricevuto una singola somministrazione di marbofloxacin intramuscolare nella regione del collo alla seguente posologia:

Gruppo	Dosaggio
A	6 mg di marbofloxacin/kg p.v.
B	8 mg di marbofloxacin/kg p.v.
C	10 mg di marbofloxacin/kg p.v.

- [Monitoraggio degli animali](#)

Per tutta la prova sperimentale gli animali sono stati monitorati per constatarne lo stato di salute attraverso una valutazione di tollerabilità generale e tollerabilità locale al punto d'inoculo con esame obiettivo generale (EOG) e particolare (EOP). Inoltre è stata valutata l'assunzione di cibo ed acqua.

- [Campionamento](#)

I campioni di sangue sono stati prelevati ad ogni animale dal *truncus brachiocephalicus* e *vena giugulare* a punti tempo predeterminati: 0 ore (pre-trattamento) - 15 - 30 - 45 minuti e 1 - 1,5 - 2 - 3 - 6 - 9 - 12 - 24 - 36 - 48 - 60 - 72 - 84 e 96 ore post-trattamento.

Il sangue prelevato è stato raccolto in provette eparinizzate che sono state centrifugate immediatamente dopo il prelievo per separarne il plasma. I campioni di plasma sono stati poi congelati ( $T \leq -15$  °C) fino al momento delle analisi.

- [Metodo d'Analisi](#)

Tutti i campioni ematici sono stati analizzati utilizzando un metodo HPLC/MS/MS sviluppato e convalidato internamente nel Laboratorio GLP (Fatro). Nella Tabella 16 sono riportati i principali parametri di validazione del metodo analitico impiegato. In Tabella 17 le Medie e Deviazione Standard dei risultati analitici ottenuti nei tre gruppi.

*Tabella 16 - Risultati relativi ai principali parametri di validazione del metodo di analisi: Range di validazione, Limite Superiore Di Quantificazione (ULOQ), Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ) e Limite di Determinazione (LOD).*

<b>Marbofloxacina</b>	<b>Range di validazione (ng/ml)</b>	<b>ULOQ (ng/ml)</b>	<b>LLOQ (ng/ml)</b>	<b>LOD (ng/ml)</b>
	<b>50– 12000</b>	<b>12000</b>	<b>50</b>	<b>10</b>

		Concentrazione di marbofloxacin (ng/ml)																
Gruppo	Animale n.	0	15 min	30 min	45 min	1 h	1,5 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h
A	Media*	-	2676	3409	4102	3904	3827	3351	2802	2346	1970	1038	634	367	282	175	133	90
	SD*	-	411	569	1267	471	770	501	447	405	456	364	325	244	178	35	38	36
B	Media *	-	4017	5371	5293	5529	5686	5373	4525	3848	3157	1615	838	422	243	139	101	65
	SD*	-	1506	1015	769	956	670	348	141	263	262	356	237	163	94	59	24	12
C	Media *	-	4887	6965	6956	7328	7321	6225	4837	3663	2874	1199	560	250	151	85	66	n.c.
	SD*	-	1290	617	1067	1306	1477	748	351	329	645	345	166	107	85	46	14	n.c.

Legenda:

-: bianco (non determinabile)

\*Media e DS sono calcolate solo considerando i dati nel range di validazione 50 -12000 ng/ml

n.c.: non calcolabile

Tabella 17 - Concentrazioni plasmatiche medie±Deviazione Standard di marbofloxacin (ng/ml) dopo somministrazione i.m. di 6 mg/kg p.v. (Gruppo A), 8 mg/kg p.v. (Gruppo B), 10 mg/kg p.v. (Gruppo C).

• [Analisi statistica](#)

L'analisi cinetica è stata condotta sui singoli animali con l'ausilio del software WinNonlin Prof. (Version 5.3, Pharsight, Ca, USA). L'analisi è stata condotta utilizzando i dati all'interno del range di validazione del metodo di analisi (50-12000 ng/ml).

I profili cinetici sono risultati ben descritti mediante analisi non-compartimentale. I parametri AUC ( $AUC_{last}$  e  $AUC_{inf}$ ),  $C_{max}$  e  $T_{max}$  sono stati calcolati mediante metodo lineare-trapezoidale (EMA/CVMP/133/99-FINAL; EMA/CVMP/016/00-Rev.2).

I parametri cinetici (media  $\pm$  DS) di marbofloxacin calcolati per i tre gruppi di suini A, B, C dopo somministrazione intramuscolare alle dosi rispettivamente di 6, 8 e 10 mg/kg p.v., sono presentati in Tabella 18.

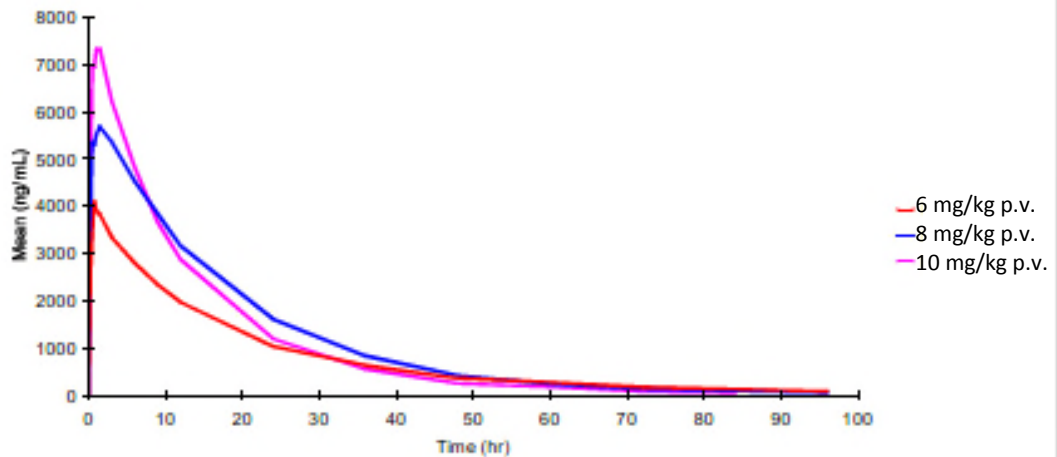
*Tabella 18 - Parametri cinetici medi di marbofloxacin ottenuti nei tre gruppi A, B e C (media  $\pm$  Deviazione Standard).*

Parameter (unit)	Mean $\pm$ SD		
	Group A (6 mg/kg p.v.)	Group B (8 mg/kg p.v.)	Group C (10 mg/kg p.v.)
$AUC_{last}$ (hr*ng/ml)	74273 $\pm$ 20387	111867 $\pm$ 10763	102445 $\pm$ 14602
$AUC_{INF}$ (hr*ng/ml)	79566 $\pm$ 25605	113681 $\pm$ 11217	103465 $\pm$ 14583
$C_{max}$ (ng/ml)	4758 $\pm$ 748	6153 $\pm$ 684	8103 $\pm$ 1568
$T_{max}$ (hr)	0,92 $\pm$ 0,34	1,00 $\pm$ 0,45	1,04 $\pm$ 0,40
$\lambda_z$ (1/hr)	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02
HL_ $\lambda_z$ (hr)	20,34 $\pm$ 9,87	14,21 $\pm$ 2,81	10,91 $\pm$ 2,18
MRT <sub>INF_obs</sub> (hr)	22,97 $\pm$ 7,24	18,42 $\pm$ 2,77	14,26 $\pm$ 2,11
CL <sub>F_obs</sub> (ml/hr)	82,62 $\pm$ 27,82	70,94 $\pm$ 6,87	98,16 $\pm$ 12,89

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

In Figura 6 è mostrato l'andamento cinetico di marbofloxacina ai tre diversi dosaggi ottenuti sulla base delle concentrazioni medie valutate ad ogni punto tempo sperimentale.

Figura 6 - Curva che descrive l'andamento delle concentrazioni ematiche medie di marbofloxacina  $\pm$  DS (ng/ml) vs tempo (h) per le tre dosi somministrate.



#### Conclusioni e discussione sulla farmacocinetica in vivo

Le caratteristiche descritte in bibliografia sono state confermate anche sperimentalmente. Nello studio condotto, marbofloxacina è rapidamente assorbita dopo somministrazione intramuscolare con dati comparabili a quelli disponibili in letteratura (Ding et al., 2010; Schneider et al., 2014; Yang et al., 2017).

Così come evidenziato dal profilo delle concentrazioni nel tempo, anche l'analisi cinetica dimostra che con l'aumentare del dosaggio di marbofloxacina è rilevabile un aumento dei valori di  $C_{max}$  che vanno da  $4758 \pm 748$  ng/ml nel Gruppo A (6 mg/kg p.v.), a  $6153 \pm 684$  ng/ml nel Gruppo B (8 mg/kg p.v.) e a  $8103 \pm 1568$  ng/ml nel Gruppo C (10 mg/kg p.v.). Questo aumento però non si dimostra proporzionale per quanto riguarda  $AUC_{0-\infty}$ , che va da  $79566 \pm 25605$  h\*ng/ml nel Gruppo A (6 mg/kg p.v.), a  $113681 \pm 11217$



$h \cdot \text{ng/ml}$  nel Gruppo B (8 mg/kg p.v.), e a  $103465 \pm 14583 h \cdot \text{ng/ml}$  nel Gruppo C (10 mg/kg p.v.).

Questi risultati non rispecchiano quanto riportato nello studio di Schneider et al., (2014) dove, a suini di 27 settimane di età sono state somministrate per via intramuscolare 3 diverse dosi di marbofloxacin (4 mg/kg, 8 mg/kg e 16 mg/kg) rilevando valori di  $AUC_{0-12h}$  proporzionali all'aumento della dose (56,9  $\mu\text{g/ml}$ , 115  $\mu\text{g/ml}$  e 228  $\mu\text{g/ml}$  rispettivamente). Nella nostra prova il Gruppo C (10 mg/kg) non presenta un aumento proporzionale dei valori di  $AUC_{0-12h}$ . Questo comportamento potrebbe essere spiegato ipotizzando un maggiore coinvolgimento dei processi di eliminazione per dosi elevate.

La  $Cl_{tot}$  di marbofloxacin dopo somministrazione muscolare di 6, 8, 10 mg/kg b.w. è risultata, rispettivamente di  $82,62 \pm 27,82$  (Gruppo A),  $70,94 \pm 6,87$  (Gruppo B) e  $98,16 \pm 12,89 \text{ mL/h}$  (Gruppo C). Questi valori sono inferiori a quelli ottenuti in altri studi condotti su scrofe gravide in allattamento e in suinetti di 3 mesi di età (Ding et al., 2010). Marbofloxacin viene escreta prevalentemente nelle urine con una biotrasformazione minima, e ciò potrebbe spiegare la più elevata clearance corporea totale riscontrata negli animali giovani e gravidi, come suggerito da Dvorchik (1982).

Dopo somministrazione di 6 mg/kg p.v., l'emivita di eliminazione della marbofloxacin è più lunga ( $20,34 \pm 9,87$  h) rispetto a quanto osservato dopo somministrazione di 8 e 10 mg/kg ( $14,21 \pm 2,81$  h e  $10,91 \pm 2,18$  h, rispettivamente). Ciò suggerisce ancora una volta che i processi di eliminazione assumono una maggiore importanza a dosi più elevate, giustificabile, probabilmente, ad esempio da un ridotto riassorbimento tubulare derivante dal gradiente di concentrazione sfavorevole a livello ematico.

Tuttavia, va osservato che una certa variabilità è stata osservata tra i soggetti del gruppo A (sebbene l'analisi statistica non abbia rivelato alcun valore anomalo), che potrebbe avere inaspettatamente aumentato le discrepanze con gli altri due gruppi per alcuni parametri PK.

In definitiva è ipotizzabile che nel suino i meccanismi deputati alla eliminazione di marbofloxacin vadano incontro a saturazione all'aumentare delle concentrazioni con perdita di linearità. La perdita di linearità non sembra garantire un aumento dell'efficacia proporzionale al di sopra di certi dosaggi.

### 3.1.2. Farmacodinamica

E' stato svolto uno studio per valutare l'attività di marbofloxacina nei confronti di *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolati da suini in diversi allevamenti. A causa della difficoltà di isolamento e reperimento per *Mycoplasma* non è stato possibile effettuare una prova sperimentale di campo.

Tra il 2011 ed il 2014, sono stati prelevati in sede autoptica da 60 suini provenienti da diversi allevamenti, 30 ceppi di *Pasteurella multocida* e 30 ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* responsabili di patologie respiratorie acute di natura opportunistica, rilevate negli allevamenti considerati.

I patogeni, non correlati tra loro e provenienti da focolai diversi di malattia respiratoria suina, sono stati opportunamente tipizzati su base biochimico-metabolica.

Fino al momento delle analisi, i ceppi batterici sono stati conservati a  $-30^{\circ}\text{C}$ , applicando le metodologie correntemente in uso presso il laboratorio di Patologia Infettiva Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università di Milano.

Per l'allestimento dell'inoculo sono state seguite pedissequamente le indicazioni contenute nel documento M31-T/1997 di NCCLS, mentre per la preparazione delle diluizioni seriali di marbofloxacina è stato impiegato il metodo a scacchiera in piastre microtiter a 96 pozzetti con fondo a U.

50 mcl della sospensione batterica di inoculo sono stati quindi distribuiti in tutti i pozzetti di ogni piastra di prova; per ogni ceppo batterico in esame sono state inoculate 2 file da 11 pozzetti, mentre il primo di ciascuna fila, privo di antibiotico, è stato utilizzato come controllo di vitalità dell'isolamento batterico in prova.

Dopo incubazione in aerobiosi a  $37^{\circ}\text{C}$  per 18-24 ore, le piastre sono state valutate con apposito visore per evidenziare l'opacamento del terreno liquido indice della crescita batterica. E' stata quindi definita la Minima Concentrazione Inibente (MIC) intesa come la minore concentrazione di principio attivo alla quale la crescita batterica non era più visibile.

Il valore di MBC (Minima Concentrazione Battericida) è stato invece determinato attraverso la sub-coltura su Agar Sangue di montone al 5% del contenuto dei due pozzetti a partire dal valore di MIC in su; lo stesso è stato prelevato, mediante puntale sterile, seminato mediante spatolamento e posto in incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  per 18-24 ore. È stata considerata come MBC la concentrazione minima del principio attivo alla quale non si è osservata alcuna crescita batterica.

In Tabella 19 sono riassunti i risultati ottenuti.

Tabella 19 - MIC e MBC di marbofloxacina.

	MIC range µg/ml	MIC <sub>50</sub> µg/ml	MIC <sub>90</sub> µg/ml	MBC µg/ml	MBC <sub>50</sub> µg/ml	MBC <sub>90</sub> µg/ml
<i>P. multocida</i>	0,0156 – 0,0625	0,0156	0,0313	0,0156 – 0,1250	0,0313	0,0313
<i>A. pleuropneumoniae</i>	0,0078 – 0,2500	0,0156	0,0313	0,0078 – 0,5000	0,01560	0,0625

Una volta definiti i valori di MIC e MBC, sugli stessi ceppi patogeni isolati è stato valutato l'Effetto Post Antibiotico (PAE) secondo il metodo descritto da Craig e Gudmundsson (1999). Due colonie di una replica su agar sangue di montone al 5% sono state inoculate in 20 ml di *Mueller-Hinton broth cation-adjusted* e allestite cinque diluizioni seriali in base 10 in brodo MH e poi incubate a 37°C per 18-24 ore.

Utilizzando uno spettrofotometro provvisto di filtro di 580 nm è stata quindi selezionata come inoculo la provetta con densità ottica prossima ma non superiore al valore di 0,3. A 1 ml di questo inoculo è stata aggiunta una quantità di marbofloxacina pari a 5 e 10 volte le MIC; le brodoculture sono quindi incubate a 37°C in aerobiosi. Per il controllo di crescita sono stati inoculati contemporaneamente 10 ml di terreno liquido senza antimicrobico.

Dopo 1, 2, 4 e 6 ore d'incubazione è stato rimosso l'antibiotico mediante diluizione 1:10<sup>3</sup> in terreno pre-riscaldato a 37°C; le sub-colture sono state quindi incubate a 37°C per 18-24 ore, valutando la crescita residuale dei singoli inoculi mediante conteggio batterico, in comparazione con un'identica preparazione allestita a partire dal controllo di crescita.

Il PAE, espresso in ore, è stato ottenuto applicando la formula  $T - C$ , dove T è il tempo necessario per avere un aumento di 1 log<sub>10</sub> della carica batterica rilevata al momento della diluizione di arresto dell'attività dell'antibiotico e C è il tempo necessario per avere un analogo aumento nella subcoltura di controllo di crescita. Un PAE lungo indica l'assenza di crescita batterica anche quando la concentrazione di antibiotico scende al di sotto delle MIC. I valori ottenuti e la durata media del PAE calcolata sono riportati in Tabella 20 e 21.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Tabella 20 - Effetto Post-Antibiotico sugli isolati di *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

PAE (ore)	<i>P. multocida</i>		<i>A. pleuropneumoniae</i>	
	N. ceppi MIC x 5	N. ceppi MIC x 10	N. ceppi MIC x 5	N. ceppi MIC x 10
2	5	-	4	-
3	3	4	13	-
4	12	7	9	15
5	10	16	4	15
6	-	3	-	-

Tabella 21- Effetto Post-Antibiotico (h) di marbofloxacin. E' riportato il tempo medio e l'intervallo temporale per *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

	MIC x 5	MIC x 10
	Media in ore (min-max)	Media in ore (min-max)
<i>Pasteurella multocida</i> (30 ceppi)	3,90 (2-5)	4,60 (3-6)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (30 ceppi)	3,43 (2-5)	4,50 (4-5)

Per *Mycoplasma hyopneumoniae* i dati di MIC<sub>90</sub> sono stati ottenuti da 50 ceppi di isolati in Europa (Belgio, Spagna e UK) e studiati recentemente dal MycoPath Study Group del CEESA (Klein et al., 2017) (Tabella 22).

Tabella 22 - Valori di MIC per *Mycoplasma hyopneumoniae* isolati nel suino in diversi Paesi europei dal 2010 al 2012 (Klein et al., 2017).

50 ceppi isolati	MIC (µg/ml)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC range
<i>M. hyopneumoniae</i>	0,03 (n=50)	0,5 (n=50)	0,002-1 (n=50)

#### Conclusioni e discussione sulla farmacodinamica

La marbofloxacin è un antibatterico ad ampio spettro d'azione con attività sia concentrazione dipendente sia tempo dipendente.

I dati sperimentali mostrano chiaramente come le MIC di marbofloxacin nei confronti dei ceppi sensibili di *Actinobacillus pleuropneumoniae* e di *Pasteurella multocida*,

*causa di infezioni respiratorie nel suino, siano ben definite e, se confrontate con quelle bibliografiche, siano rimaste praticamente invariate nel corso degli anni.*

*Infatti i dati raccolti e pubblicati dal VetPath Study Group del CEESA (de Jong et al., 2014; Klein et al., 2015) mostrano valori di MIC<sub>50</sub> di marbofloxacin di 0,03 µg/ml per i ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 0,06 µg/ml per i ceppi di *Pasteurella multocida* isolati da suini infetti in vari Paesi Europei dal 2002 al 2012.*

*I dati ottenuti dal nostro studio sono relativamente inferiori a quelli presentati dal CEESA, ma è da considerare che si riferiscono a patogeni isolati solo in Italia e in un numero inferiore di ceppi. I valori di MIC risultano comunque paragonabili ai dati bibliografici e confermano che la sensibilità a marbofloxacin di *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* è rimasta invariata nel corso di più di 15 anni.*

*Come già sottolineato, per *Mycoplasma hyopneumoniae* non è stato possibile la valutazione sperimentale per la difficoltà di isolamento di questo patogeno.*

*Sono comunque reperibili dati aggiornati di MIC presentati sempre dal Gruppo di studio del CEESA (Klein et al. 2017). Nello studio, condotto in 3 Paesi Europei dal 2009 al 2012 isolando ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* da animali infetti, sono stati determinati valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> di 0,03 µg/ml e MIC<sub>90</sub> 0,5 µg/ml rispettivamente. Questi dati sono da ritenersi esaustivi e aggiornati e saranno quindi utilizzati per la discussione dell'efficacia clinica.*

*Il PAE di marbofloxacin calcolato sui ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* e di *Pasteurella multocida* ha evidenziato che l'effetto post antibiotico aumenta con l'aumentare della concentrazione di antibiotico.*

*Le informazioni disponibili in bibliografia sull'effetto post-antibiotico di marbofloxacin nei confronti delle specie batteriche considerate e provenienti da malattia respiratoria acuta del suino, sono carenti; infatti, sia per *P. multocida*, sia per *A. pleuropneumoniae*, non esistono dati di possibile confronto.*

*In linea generale il significato clinico dell'effetto post-antibiotico è che se un principio attivo manifesta in vitro un PAE prolungato ha maggiori possibilità di produrre risultati terapeutici migliori; infatti, se la concentrazione ematica e tissutale si mantiene per più tempo sopra le MIC, è oggettivamente più difficile che i batteri ancora presenti possano riprendere l'attività replicativa.*

### *Capitolo 3 Studi Sperimentali*

*Nel caso dei chinoloni, che impediscono la sintesi del DNA batterico attraverso il blocco della DNA-girasi, il PAE può rappresentare il tempo necessario per la dissociazione del principio attivo dal target batterico dopo aver portato a termine la sua azione.*

*Inoltre, la determinazione del PAE può fornire informazioni addizionali sull'azione degli antibiotici rispetto ai test di efficacia più tradizionalmente applicati, anche in vivo; in generale, è possibile affermare che a un PAE protratto corrisponde più facilmente un esito terapeutico favorevole, mentre è vero il contrario in caso di antibiotici con PAE breve.*

*Il risultato ottenuto con lo studio suggerisce per marbofloxacin somministrata a dosaggi di 6 mg/kg, 8 mg/kg e 10 mg/kg la possibilità di prevedere un intervallo di somministrazione lungo senza perdere l'efficacia antibatterica.*

### **3.1.3. Correlazione PK/PD**

La correlazione PK/PD per marbofloxacinina somministrata per via intramuscolare nel suino, a tra diversi dosaggi (6, 8 e 10 mg/kg) è stata valutata per determinare il dosaggio one-shot più efficace nei confronti dei patogeni testati.

Per il calcolo degli indicatori PK/PD sono stati utilizzati i dati cinetici e dinamici ottenuti negli studi sperimentali sopra esposti ad eccezione del Mycoplasma per cui ci si è riferiti ai dati bibliografici aggiornati reperiti in letteratura.

I parametri di farmacocinetica sono stati calcolati applicando un modello non compartimentale sulle concentrazioni di marbofloxacinina fino a 24 ore tramite software dedicato, Phoenix WinNonlin (Version 6.4, Pharsight, Ca, USA).

I valori ottenuti con l'analisi sono riportati nella Tabella 23.



### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Tabella 23 - Parametri farmacocinetici medi di marbofloxacin ottenuti nei gruppi A, B e C calcolati fino a 24 h dopo somministrazione (valori singoli e media  $\pm$ DS).

6 mg/kg p.v.							
Animale	AUC <sub>24h</sub> (h* $\mu$ g/ml)	AUC <sub>INF</sub> (h* $\mu$ g/ml)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/ml)	T <sub>max</sub> (h)	Lambda z (1/h)	HL Lambda z (h)	MRT <sub>24h</sub> (h)
1	52,80	65,21	4,08	0,50	0,07	9,98	8,60
2	38,13	47,38	4,14	1,00	0,07	10,13	8,64
3	43,34	52,98	6,12	0,75	0,07	10,03	8,28
4	64,93	96,41	4,48	1,00	0,05	14,93	9,56
5	56,06	81,58	4,89	0,75	0,05	14,43	9,44
6	55,69	92,55	4,84	1,50	0,04	18,54	9,66
Media	<b>51,82</b>	<b>72,68</b>	<b>4,76</b>	<b>0,92</b>	<b>0,06</b>	<b>13,01</b>	<b>9,03</b>
DS	<b>8,81</b>	<b>18,80</b>	<b>0,68</b>	<b>0,34</b>	<b>0,01</b>	<b>3,23</b>	<b>0,54</b>
8 mg/kg p.v.							
Animale	AUC <sub>24h</sub> (h* $\mu$ g/ml)	AUC <sub>INF</sub> (h* $\mu$ g/ml)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/ml)	T <sub>max</sub> (h)	Lambda z (1/h)	HL Lambda z (h)	MRT <sub>24h</sub> (h)
7	78,43	113,09	6,92	0,50	0,05	14,02	9,43
8	86,25	141,09	5,23	0,50	0,04	17,33	9,99
9	79,08	98,42	6,97	1,00	0,07	10,42	8,44
10	86,15	117,32	6,15	1,00	0,06	12,53	9,16
11	78,66	94,96	5,70	1,50	0,07	9,36	8,66
12	83,42	108,98	5,96	1,50	0,06	11,34	9,17
Media	<b>81,99</b>	<b>112,31</b>	<b>6,15</b>	<b>1,00</b>	<b>0,06</b>	<b>12,50</b>	<b>9,14</b>
DS	3,41	15,05	0,62	0,41	0,01	2,62	<b>0,50</b>
10 mg/kg p.v.							
Animale	AUC <sub>24h</sub> (h* $\mu$ g/ml)	AUC <sub>INF</sub> (h* $\mu$ g/ml)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/ml)	T <sub>max</sub> (h)	Lambda z (1/h)	HL Lambda z (h)	MRT <sub>24h</sub> (h)
13	83,85	110,88	7,72	0,50	0,06	12,20	8,67
14	74,42	86,55	10,11	1,50	0,08	9,06	7,34
15	71,88	82,96	6,38	1,00	0,08	8,47	7,88
16	84,16	95,72	7,91	0,75	0,09	7,96	7,81
17	100,20	127,29	9,85	1,00	0,06	10,88	8,63
18	83,63	96,45	6,65	1,50	0,09	8,13	8,26
Media	<b>83,02</b>	<b>99,97</b>	<b>8,10</b>	<b>1,04</b>	<b>0,08</b>	<b>9,45</b>	<b>8,10</b>
DS	<b>9,09</b>	<b>15,08</b>	<b>1,43</b>	<b>0,37</b>	<b>0,01</b>	<b>1,57</b>	<b>0,47</b>

Per avere un approccio ancor più cautelativo nel valutare e massimizzare il più possibile l'efficacia del farmaco in esame nei confronti di *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, i valori di MIC utilizzati per la definizione del rapporto PK/PD sono quelli di MIC<sub>90</sub>.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Nella Tabella 24 vengono riportati i dati di PK/PD per marbofloxacin (AUC<sub>0-24</sub>/MIC<sub>90</sub> e C<sub>max</sub>/MIC<sub>90</sub>) calcolati per i tre dosaggi e somministrati per via intramuscolare a 6, 8 e 10 mg/kg p.v. nel suino.

Tabella 24 - Valori PK/PD individuali e medie (±DS) ottenuti a seguito di trattamento intramuscolare nel suino a 6, 8 e 10 mg di marbofloxacin/kg p.v..

6 mg/kg p.v.						
Animale	<i>P. multocida</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>A. pleuropneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>M. hyopneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,5 (µg/ml)	
	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC
1	130,45	1687,00	130,45	1687,00	8,16	105,60
2	132,20	1218,14	132,20	1218,14	8,28	76,26
3	195,59	1384,51	195,59	1384,51	12,24	86,68
4	143,23	2074,44	143,23	2074,44	8,96	129,86
5	156,07	1791,04	156,07	1791,04	9,78	112,12
6	154,57	1779,11	154,57	1779,11	9,68	111,38
Media	<b>152,02</b>	<b>1655,71</b>	<b>152,02</b>	<b>1655,71</b>	<b>9,52</b>	<b>103,65</b>
DS	<b>21,82</b>	<b>281,33</b>	<b>21,82</b>	<b>281,33</b>	<b>1,50</b>	<b>19,29</b>
8 mg/kg p.v.						
Animale	<i>P. multocida</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>A. pleuropneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>M. hyopneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,5 (µg/ml)	
	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC
7	221,02	2505,88	221,02	2505,88	13,84	156,86
8	167,12	2755,61	167,12	2755,61	10,46	172,50
9	222,59	2526,54	222,59	2526,54	13,94	158,16
10	196,33	2752,54	196,33	2752,54	12,30	172,30
11	182,20	2513,03	182,20	2513,03	11,40	157,32
12	190,26	2665,04	190,26	2665,04	11,92	166,84
Media	<b>196,59</b>	<b>2619,77</b>	<b>196,59</b>	<b>2619,77</b>	<b>12,31</b>	<b>164,00</b>
DS	<b>19,95</b>	<b>108,92</b>	<b>19,95</b>	<b>108,92</b>	<b>1,37</b>	<b>7,47</b>
10 mg/kg p.v.						
Animale	<i>P. multocida</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>A. pleuropneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,0313 (µg/ml)		<i>M. hyopneumoniae</i> MIC <sub>90</sub> 0,5 (µg/ml)	
	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC	C <sub>max</sub> /MIC	AUC <sub>0-24</sub> /MIC
13	246,71	2679,00	246,71	2679,00	15,44	167,70
14	322,84	2377,61	322,84	2377,61	20,22	148,84
15	203,96	2296,48	203,96	2296,48	12,76	143,76
16	252,59	2688,89	252,59	2688,89	15,82	168,32
17	314,57	3201,42	314,57	3201,42	19,70	7,47
18	212,52	2671,79	212,52	2671,79	13,30	167,70
Media	<b>258,87</b>	<b>2652,53</b>	<b>258,87</b>	<b>2652,53</b>	<b>16,21</b>	<b>166,05</b>
DS	<b>45,73</b>	<b>290,41</b>	<b>45,73</b>	<b>290,41</b>	<b>3,14</b>	<b>19,91</b>

Come si può osservare i valori ottimali di  $AUC_{0-24}/MIC \geq 100-125$  e di  $C_{max}/MIC \geq 8-10$  sono stati ampiamente superati in particolar modo per i dosaggi 8 mg/kg e 10 mg/kg.

Così come evidenziato dal profilo delle concentrazioni di marbofloxacin in funzione del tempo, anche la correlazione PK/PD evidenzia che con l'aumentare del dosaggio da 8 a 10 mg/kg p.v. non è rilevabile un proporzionale aumento dei rapporti di  $C_{max}/MIC$  e  $AUC_{0-24}/MIC$ .

#### Conclusioni e discussione sulla valutazione della correlazione PK/PD

*La correlazione PK/PD è stata eseguita con gli indicatori più appropriati per i FLQ che sono  $C_{max}/MIC$  e  $AUC_{0-24}/MIC$ .*

*Per avere un approccio ancor più cautelativo nel valutare l'efficacia del farmaco in esame e limitare il rischio di sviluppo di resistenze sono stati utilizzati i valori delle  $MIC_{90}$  ottenuti sperimentalmente per *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* e quelli riportati in letteratura per *Mycoplasma hyopneumoniae*.*

*All'aumentare del dosaggio non corrisponde un proporzionale miglioramento dei parametri valutati, dovuto probabilmente al non proporzionale aumento della AUC osservato nello studio di farmacocinetica.*

*I risultati mostrano che i valori di  $C_{max}/MIC$  e  $AUC_{0-24}/MIC$  per i tre dosaggi considerati superano gli indici di efficacia per i fluorochinoloni ( $AUC/MIC \geq 100-125$  e di  $C_{max}/MIC \geq 8-10$ ). Per il dosaggio da 6 mg/kg i risultati sono al limite per *Mycoplasma* con il rapporto  $C_{max}/MIC=9,52$ . Questo dato, nell'ottica di prevenire fenomeni di resistenza, fa sì che i dosaggi da 8 mg/kg p.v. e da 10 mg/kg p.v. siano da preferire per procedere con una indagine clinica. Il dosaggio di 10 mg/kg p.v., anch'esso con indici di correlazione ottimali, è tuttavia da escludere in ottica di utilizzare il minor dosaggio efficace per evitare eventuali effetti collaterali del principio attivo.*

*La correlazione dei parametri PK/PD si conferma essere uno strumento importante per l'individuazione di una dose efficace. Alcuni Autori (Vilalta et al., 2014), nonostante confermino l'importanza dell'approccio PK/PD, sottolineano anche alcune criticità, come ad esempio il fatto che i calcoli PK/PD si basano sulla concentrazione totale del farmaco nel plasma che potrebbe non rappresentare la reale concentrazione nei tessuti target. Nel*

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

*nostro caso è però da considerare che marbofloxacin è un principio attivo che, accanto ad una alta biodisponibilità, presenta un basso legame siero-proteico e una distribuzione nei tessuti elevata e abbastanza uniforme (Dorey et al., 2017), per cui si può desumere che le concentrazioni ematiche siano paragonabili a quelle tessutali.*

*Altre variabili come età, sesso e razza degli animali utilizzati in prova o anche il numero di ceppi batterici testati possono influenzare il risultato della correlazione PK/PD; ma nonostante questo l'approccio integrato rimane comunque uno dei mezzi più efficienti per una valutazione preliminare di efficacia clinica prima di una indagine di campo.*

*Pertanto, sulla base dei dati cinetici e sui risultati della correlazione PK/PD, il dosaggio di 8 mg/kg p.v. con somministrazione unica risulta il più appropriato per l'indagine di efficacia clinica.*

## 3.2. EFFICACIA CLINICA

Sulla base dei risultati ottenuti negli studi di correlazione PK/PD, la dose di 8 mg di marbofloxacin/kg p.v. in somministrazione unica è stata prescelta per l'esecuzione di una prova clinica in GCP.

### 3.2.1. Studio Clinico

E' stato svolto uno studio clinico nel rispetto delle Buone Pratiche Cliniche Veterinarie (GCP), in conformità alle Linee Guida di riferimento sulla conduzione di studi clinici (EMA, 2000), sul benessere animale (Direttiva 2010/63/EU recepita in Italia da D.Lvo 26/2014) e in seguito ad autorizzazione da parte del Ministero della Salute italiano. Gli animali spontaneamente colpiti da patologia respiratoria (SRD) hanno ricevuto una singola somministrazione one-shot di marbofloxacin per via intramuscolare alla dose di 8 mg/kg p.v..

L'efficacia della dose one-shot di marbofloxacin (Masterflox 10 - Fatro S.p.A.) è stata valutata per confronto con una dose one-shot di tulatromicina 2,5 mg/kg p.v. (Draxxin - Zoetis) la cui efficacia è riconosciuta per gli stessi patogeni respiratori.

- **Disegno di studio**

Lo studio di campo è stato condotto in cieco, randomizzato, con controllo positivo su 261 suini in due allevamenti (A e B) localizzati nel nord Italia.

In seguito all'insorgenza di un focolaio di SRD in ogni allevamento è stata eseguita l'autopsia di 7 suini dell'allevamento A e 8 animali dell'allevamento B morti spontaneamente o soppressi per motivi umanitari a causa della gravità delle condizioni cliniche. Campioni di tessuto polmonare sono stati analizzati dal Laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna per l'isolamento dei patogeni coinvolti.

In seguito a conferma della presenza dei patogeni target sono stati prelevati campioni tramite tamponi nasali da 59 suini arruolati per l'esame batteriologico.

Dai campioni è stato possibile isolare *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Pasteurella multocida*. Alcuni campioni sono anche risultati positivi alla PCR anche per *Mycoplasma hyopneumoniae*.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Gli animali arruolati sono stati suddivisi tramite un programma di distribuzione casuale e in base al peso in uno dei due gruppi sperimentali: G1 e G2 che differivano per il prodotto ricevuto.

Ogni animale arruolato per lo studio è stato tenuto in osservazione per 10 giorni dopo la somministrazione.

- Animali**

Per l'esecuzione dello studio sono stati utilizzati 261 suini (139 maschi castrati e 122 femmine) con peso da 32,8 a 50,9 kg al momento dell'inclusione.

Tabella 25 - Temperatura rettale e peso degli animali.

	All.	Gruppo	N	Media	DS	ES	95% IC		Min	Max
Temperatura rettale (°C)	A	G1	106	40,134	0,191	0,019	40,097	40,171	40,0	41,0
		G2	104	40,163	0,178	0,018	40,128	40,197	40,0	41,0
		Total	210	40,148	0,185	0,013	40,123	40,173	40,0	41,0
	B	G1	25	40,340	0,277	0,055	40,226	40,454	40,0	41,0
		G2	26	40,319	0,327	0,064	40,187	40,451	40,0	41,1
		Total	51	40,329	0,301	0,042	40,245	40,414	40,0	41,1
Peso (kg)	A	G1	106	33,858	5,209	0,506	32,855	34,862	20,0	49,0
		G2	104	33,192	4,827	0,473	32,254	34,131	20,0	46,0
		Total	210	33,529	5,023	0,347	32,845	34,212	20,0	49,0
	B	G1	25	49,600	3,391	0,678	48,200	51,000	43,0	57,0
		G2	26	50,269	3,293	0,646	48,939	51,599	45,0	55,0
		Total	51	49,941	3,325	0,466	49,006	50,876	43,0	57,0

Durante lo studio gli animali sono stati stabulati in box collettivi contenenti al massimo 40 animali ed alimentati tre volte al giorno con un mangime idoneo preparato in azienda mentre l'acqua era disponibile *ad libitum*.

Gli animali sono stati inclusi/esclusi sulla base dei seguenti criteri:

Criteri di inclusione

- Suini con temperatura  $\geq 40^{\circ}$  C con segni clinici di SRD da moderati (respirazione alterata con leggera depressione e dispnea evidente, tosse e starnuti) a severi (respirazione gravemente alterata, moderata depressione e pronunciata dispnea, tosse e starnuti, respirazione anche tramite la bocca)
- Animali con condizioni generali soddisfacenti alla visita clinica del Tempo 0 (D0)

- Animali per i quali non erano presenti situazioni citate nelle controindicazioni dei prodotti utilizzati.

#### Criteri di esclusione

- Suini trattati con antibiotici
- Suini con lesioni nella zona prevista per l'inoculo
- Animali con concomitanti patologie al D0 che potevano interferire con le condizioni cliniche da SRD
- Animali con concomitanti patologie al D0 che potevano compromettere il completamento dello studio
- Suini per i quali si prevedeva l'uso di antibiotici attivi contro i patogeni che causano la SRD nei 10 giorni successivi
- Suini con sensibilità nota a marbofloxacina, tulatromicina o altri FLQ.

#### • **Trattamento**

Gli animali sono stati trattati in base al gruppo di appartenenza:

- Gruppo G1 ha ricevuto un'unica somministrazione intramuscolare di 8 mg di marbofloxacina/ kg p.v. equivalenti a 2 ml/25 kg p.v. di Masterflox 10 (Fatro S.p.A.)
- Gruppo G2 ha ricevuto un'unica somministrazione intramuscolare di 2,5 mg di tulatromicina/kg p.v. equivalenti a 1 ml/40 kg p.v. di Draxxin (Zoetis).

Il giorno del trattamento gli animali sono stati accuratamente pesati per rilevare il peso individuale di ciascun suino ed effettuare quindi il calcolo preciso della dose.

Le somministrazioni sono state effettuate tutte nella regione del collo sul lato sinistro.

Lo studio è stato condotto in cieco; solo il veterinario, che ha somministrato i prodotti, e lo statistico, che si è occupato della randomizzazione e suddivisione degli animali nei due gruppi sperimentali, erano a conoscenza del disegno di studio e del prodotto somministrato ai due gruppi. Ogni suino arruolato è stato incluso in un blocco di due animali successivamente distribuiti in uno dei due gruppi in base al sistema casuale di assegnazione al trattamento.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

I ricercatori che si sono occupati della valutazione clinica degli animali e dell'efficacia erano all'oscuro del trattamento somministrato agli animali per tutta la durata della fase in vivo.

I ricercatori hanno visitato ogni animale immediatamente prima della somministrazione e i giorni 1, 2, 3, 4, 7 e 10 successivi. Gli animali che hanno continuato a manifestare segni clinici di SRD o altri sintomi di malattia sono stati visitati anche negli altri giorni di studio.

- **Risultati**

La valutazione statistica ha permesso di confermare che gli animali arruolati nei due allevamenti erano statisticamente omogenei per quanto riguarda il sesso, il numero di animali per box e la popolazione di patogeni. Il numero di soggetti era statisticamente corretto e sufficiente per lo scopo dello studio. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative per i parametri di temperatura rettale e peso tra i due gruppi (Tabelle 26 e 27).

Anche l'incremento ponderale giornaliero è risultato conforme all'età degli animali in prova.

Tabella 26 - Temperatura rettale °C.

Study day	Group	N	Mean	DS	ES	95% IC	Min	Max	P value	
Day 0	G1	131	40,173	0,224	0,020	40,135	40,212	40,0	41,0	0,459 (n.s.)
	G2	130	40,194	0,224	0,020	40,155	40,233	40,0	41,1	
Day 1	G1	131	39,643	0,334	0,029	39,585	39,700	38,7	40,5	0,796 (n.s.)
	G2	130	39,632	0,318	0,028	39,577	39,688	38,8	40,2	
Day 2	G1	131	39,502	0,375	0,033	39,438	39,567	38,6	40,5	0,688 (n.s.)
	G2	130	39,521	0,369	0,032	39,457	39,585	38,5	40,4	
Day 3	G1	123	39,327	0,400	0,036	39,256	39,398	38,2	40,2	0,864 (n.s.)
	G2	121	39,336	0,466	0,042	39,252	39,420	38,2	40,6	
Day 4	G1	119	39,216	0,427	0,039	39,139	39,293	38,2	40,5	0,764 (n.s.)
	G2	114	39,198	0,471	0,044	39,111	39,286	38,0	40,4	
Day 7	G1	113	39,128	0,421	0,040	39,050	39,207	38,2	40,4	0,968 (n.s.)
	G2	108	39,126	0,453	0,044	39,040	39,212	38,3	40,4	
Day 10	G1	108	39,178	0,428	0,041	39,096	39,259	38,2	39,9	0,874 (n.s.)
	G2	101	39,168	0,433	0,043	39,083	39,254	38,3	39,9	



Tabella 27 - Peso corporeo.

Study day	Group	N	Mean	DS	ES	Min	Max	P value
Peso (kg) Day 0	G1	131	36,86	7,91	0,69	20	57	0,789
	G2	130	36,61	9,23	0,72	20	55	
Peso (kg) Day 10	G1	131	41,27	8,14	0,71	27	60	0,907
	G2	129	41,15	8,45	0,74	28	59	
ADG (g)	G1	131	440,50	261,30	0,02	-500,0	1000,0	0,642
	G2	129	455,00	243,00	0,02	-400,0	1100,0	

I suini con temperatura superiore a 40°C e segni clinici di SRD da moderati a severi o suini con sintomi di SRD che, per una questione di benessere animale, hanno reso necessario un ulteriore intervento terapeutico, oppure sono morti a causa di SRD sono stati classificati come “Fallimento terapeutico”. La valutazione dell’efficacia (percentuale di guarigione) si è quindi basata sulla percentuale di animali che hanno completato lo studio senza essere esclusi e che sono arrivati a guarigione clinica.

Dal giorno 2 al giorno 10 dopo la somministrazione sono stati esclusi e classificati come fallimento terapeutico 23 animali su 131 nel Gruppo G1 e 29 animali su 130 nel Gruppo G2 corrispondenti, rispettivamente, al 17,6% e 22,3%. I risultati sono riassunti in Tabella 28.

L’Efficacia (E) è stata valutata con la seguente equazione:

$$E: \left\{ \frac{\text{N. di animali che hanno completato lo studio al D10}}{\text{N. di animali trattati al D0} - \text{N. di animali esclusi dallo studio per ragioni non riferite a patologie respiratorie}} \right\} \times 100$$

La non inferiorità (CI=10%) è stata valutata sulla percentuale di animali che hanno completato lo studio al D10 con le ipotesi statistiche standard  $P=0,08$  e  $\alpha=0,05$ . L’indice di mortalità è stato analizzato usando test di Fisher. Altri parametri analizzati sono stati l’incremento di peso corporeo e la temperatura rettale che sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA).

La marbofloxacin ha mostrato un’efficacia pari al 82,44% mentre per la tulatromicina è risultata del 77,69%, dimostrando che l’efficacia clinica del trattamento

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

one-shot con marbofloxacin è paragonabile a quella già consolidata e riconosciuta di tulatromicina.

Tabella 28 - Valutazione dell'efficacia.

Gruppo	Totale	Animali guariti		Animali esclusi		Efficacia	95% CI
Gruppo 1	131	108	(82,4%)	23	(17,6%)	82,44%	-4,98 to +14,4
Gruppo 2	130	101	(77,7%)	29	(22,3%)	77,69%	-5,52 to + 14,9
Totale	261	209	(80,1%)	52	(19,9%)	$p=0,3367$	

#### Conclusioni e discussione sullo studio di Efficacia Clinica

*Lo studio è stato condotto in conformità alle GCP in cieco senza che i ricercatori fossero a conoscenza dei prodotti somministrati.*

*I patogeni sono stati identificati con metodiche adeguate in strutture certificate.*

*Il numero di animali e le caratteristiche sono risultati appropriati per lo scopo dello studio. I due gruppi di animali sono risultati omogenei in tutte le caratteristiche valutate.*

*Gli animali sono stati correttamente trattati e la metodica di somministrazione ha garantito per entrambi i gruppi l'assunzione delle dosi previste.*

*Durante lo studio non è stata registrata alcuna reazione avversa e la tollerabilità locale è stata ottima.*

*Lo studio ha permesso di dimostrare che la somministrazione intramuscolare di una dose one-shot di marbofloxacin (8 mg/kg p.v.) è risultata efficace nel 82,44% dei casi.*

*L'efficacia di marbofloxacin (82,44%) alla posologia di 8 mg /kg p.v. in dose unica è risultata non inferiore all'efficacia di tulatromicina (77,69%) anch'essa in dose singola (2,5 mg/kg p.v.) attualmente autorizzata per la terapia di SRD nel suino sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, e *Mycoplasma hyopneumoniae*.*

*Questi risultati di campo confermano i dati ottenuti con la correlazione PK/PD, mostrando che la cinetica di una singola somministrazione one-shot di 8 mg/kg p.v. di marbofloxacin correlata al suo PAE portano a guarigione clinica animali spontaneamente infetti da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, e *Mycoplasma hyopneumoniae*.*

### 3.3. PROFILO DI SICUREZZA

Dopo conferma che la dose unica di 8 mg di marbofloxacina/kg p.v. è risultata efficace nei confronti della patologia respiratoria suina sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, sono state condotte prove sperimentali per determinare il profilo di sicurezza della nuova posologia one-shot per l'uomo, per l'animale e per l'ambiente.

#### 3.3.1. Studio di Cinetica Residuale

La deplezione residuale nei tessuti di suino è stata valutata mediante uno studio sperimentale in vivo condotto in GLP ed in conformità alle Linee Guida di riferimento (VICH GL49, VICH GL48, EMA/CVMP/VICH/463202/2009 e EMEA/CVMP/542/03 FINAL), alle normative in materia di salvaguardia del benessere animale (Direttiva 2010/63/EU recepita in Italia dal D.Lgs. 26/2014) e in seguito ad Autorizzazione da parte del Ministero della Salute italiano. Lo studio ha lo scopo di fornire informazioni relative alla sicurezza per il consumatore che assume derrate alimentari provenienti da animali trattati con un medicinale veterinario contenente marbofloxacina e somministrato alla dose singola di 8 mg /kg p.v. per via intramuscolare nella specie target.

- **Animali**

Per l'esecuzione dello studio sono stati utilizzati 20 suini magroni, 10 maschi e 10 femmine, ibridi commerciali clinicamente sani, di circa 5 mesi di età e con peso vivo compreso tra i 50,0 e i 63,0 kg. Tutti i soggetti non avevano ricevuto alcun trattamento farmacologico nei trenta giorni precedenti l'inizio della prova.

I suini sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali (Gruppo A, B, C e D) di 5 animali ciascuno (maschi e femmine) che differivano per tempo di macellazione e campionamento (Tabella 29).

Tabella 29 - Tempo di sacrificio e campionamento dei suini dei gruppi A, B, C e D.

Gruppo	Numero identificativo individuale (sesso)	Tempo di sacrificio e campionamento dalla somministrazione
A	1 (M), 2 (F), 3 (M), 4 (F), 5 (M)	2 giorni
B	6 (F), 7 (M), 8 (M), 9 (F), 10 (M)	4 giorni
C	11 (M), 12 (F), 13 (M), 14 (F), 15 (F)	6 giorni
D	16 (F), 17 (M), 18 (M), 19 (F), 20 (F)	8 giorni

M = maschi      F = femmine

L'alimentazione, costituita da razione di mangime completo, è stata fornita due volte al giorno in relazione al peso degli animali; l'acqua è stata fornita *ad libitum*.

Durante tutto lo studio sono state effettuate osservazioni cliniche (EOG e EOP) per stabilire il buono stato di salute dei soggetti in prova. E' stata inoltre effettuata una valutazione di tollerabilità locale e generale durante la somministrazione e 1, 2, 3, 12, 24 e 48 ore dopo il trattamento al fine di evidenziare qualunque alterazione dovuta alla somministrazione del prodotto.

- **Trattamento**

Gli animali sono stati accuratamente pesati per calcolare la corretta dose individuale da somministrare.

E' stata quindi somministrata per via intramuscolare la dose 8 mg di marbofloxacin/kg p.v. in singola somministrazione (equivalente a 2 ml/25 kg p.v. di Masterflox 10 – Fatro S.p.A.).

Le somministrazioni sono state effettuate nella regione del collo.

- **Campionamento**

Il sacrificio è stato eseguito con metodi umanitari 2, 4, 6 e 8 giorni dopo la somministrazione di marbofloxacin.

Da ogni animale sono stati prelevati i seguenti organi e tessuti:

- fegato
- rene
- grasso+cute
- muscolo
- sito inoculo

- Metodo di analisi**

La determinazione analitica di marbofloxacin nei tessuti suino è stata effettuata in tutti i tessuti mediante un metodo HPLC/MS/MS sviluppato internamente a Fatro S.p.A. e convalidato in conformità al Notice to Applicant volume 8 ed alla VICH GL49 (European Union, 2005; EMA, 2015).

I parametri di validazione del metodo sono riassunti in Tabella 30.

*Tabella 30 - Valori di MRL, Limite superiore di Quantificazione (ULOQ), Limite inferiore di Quantificazione (LLOQ), Limite di Determinazione (LOD).*

Tessuto	MRL* µg/kg	RANGE DI VALIDAZIONE µg/kg	ULOQ µg/kg	LLOQ µg/kg	LOD µg/kg
<b>Fegato, rene e muscolo</b>	<b>150,0</b>	<b>75,0- 300,0</b>	<b>300,0</b>	<b>75,0</b>	<b>3,0</b>
<b>Pelle+grasso</b>	<b>50,0</b>	<b>75,0- 300,0</b>	<b>100,0</b>	<b>25,0</b>	<b>3,0</b>

Legenda: MRL: Massimo Limite Residuale

ULOQ: Limite Superiore di Quantificazione

LLOQ: Limite Inferiore di Quantificazione

LOD: Limite di Determinazione

\* Regolamento UE n. 37/2010 della Commissione Europea

Precisione ed accuratezza sono state determinate a quattro concentrazioni. Il metodo può essere utilizzato per determinare, tramite estrapolazione, concentrazioni fino a 1250 µg/kg in campioni di fegato, rene e muscolo e fino a 600 µg/kg in pelle+grasso, perché anche a questi livelli sia l'accuratezza sia la precisione risultano all'interno dei limiti definiti dalle Linee Guida.

- Risultati**

Il principio attivo marbofloxacinina è incluso nel Regolamento UE n. 37/2010 della Commissione Europea con i valori di seguito riportati (Tabella 31).

*Tabella 31 – Valori di MRL di marbofloxacinina nei tessuti di animali (Estratto dal Regolamento 37/2010 UE, 2010).*

20.1.2010		IT	Gazzetta ufficiale dell'Unione europea			L 15/47
Sostanze farmacologicamente attive	Residuo marcatore	Specie animale	LMR	Tessuti campione	Altre disposizioni (conformemente all'articolo 14, paragrafo 7, del regolamento (CE) n. 470/2009)	Classificazione terapeutica
Marboflossacina	Marboflossacina	Bovini, suini	150 µg/kg 50 µg/kg 150 µg/kg 150 µg/kg	Muscolo Grasso Fegato Rene	Per i suini l'LMR del grasso si riferisce a «pelle e grasso in proporzioni naturali»	Agenti antinfettivi/Antibiotici
		Bovini	75 µg/kg	Latte		

I valori residuali sono stati quindi determinati per ogni suino in muscolo, pelle e grasso, fegato, rene e sito d'inoculo (considerando il campione di core e surrounding) come richiesto dalle Linee Guida di riferimento (VICH GL48; EMEA/CVMP/542/03/FINAL).

Nella Tabella 32 sono riportati i valori residuali ottenuti nei tessuti campionati da ciascun animale trattato ai vari punti tempo di sacrificio.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Tabella 32 - Concentrazioni residuali di marbofloxacina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nei tessuti di suino dopo trattamento intramuscolare con una singola dose di 8 mg/kg p.v..

Tempo di sacrificio (Gruppo)	Animale	Fegato ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Rene ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Pelle+grasso ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Muscolo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Sito d'inoculo Core (ISc) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Sito d'inoculo Surrounding (ISs) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
2 giorni (Gruppo A)	1	1090,6	> ULOQ	298,8	> ULOQ	1018,5	1133,3
	2	785,1	> ULOQ	69,2	790,7	600,1	778,0
	3	1193,0	> ULOQ	102,2	1218,0	873,7	1177,5
	4	1038,2	> ULOQ	246,7	1165,1	1018,0	1008,9
	5	1006,1	> ULOQ	113,9	1074,4	892,6	1002,5
4 giorni (Gruppo B)	6	81,4	289,4	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	7	283,5	857,2	32,9	234,1	196,7	215,5
	8	<LLOQ	297,0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	9	137,8	378,0	<LLOQ	112,8	84,0	99,9
	10	127,4	384,0	<LLOQ	113,1	<LLOQ	<LLOQ
6 giorni (Gruppo C)	11	<LLOQ	119,8	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	12	<LLOQ	90,1	< LOD	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	13	<LLOQ	98,2	< LOD	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	14	<LLOQ	132,7	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	15	<LLOQ	116,1	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
8 giorni (Gruppo D)	16	<LLOQ	<LLOQ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	17	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	< LOD	<LLOQ
	18	<LLOQ	<LLOQ	< LOD	<LLOQ	< LOD	< LOD
	19	<LLOQ	<LLOQ	< LOD	<LLOQ	<LLOQ	< LOD
	20	<LLOQ	<LLOQ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

>ULOQ: maggiore del limite di quantificazione superiore

<LLOQ: inferiori al limite di quantificazione inferiore

<LOD: inferiore al limite di determinazione

A 2 giorni dal trattamento (gruppo A) i residui di marbofloxacina nei tessuti esaminati risultano superiori agli MRL e, con l'eccezione di un campione di pelle+grasso, sono superiori anche al Limite Superiore di Quantificazione del metodo (ULOQ).

Dopo 4 giorni (gruppo B) dalla somministrazione le concentrazioni residuali di marbofloxacina risultano ancora superiori a ULOQ in tre campioni di rene e al di sopra di MRL, ma sono quantificabili in due campioni di rene, un campione di fegato, muscolo, sito d'inoculo core (ISc) e sito d'inoculo surrounding (ISs). In tre campioni di fegato, due di muscolo e uno di pelle+grasso, ISc e ISs, le concentrazioni sono inferiori agli MRL e sono

quantificabili. In tutti gli altri campioni i residui sono risultati inferiori al Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ).

I suini soppressi 6 giorni dopo la somministrazione di marbofloxacina (gruppo C), presentano concentrazioni di principio attivo inferiori agli MRL in tutti i campioni di tessuti compreso il sito d'inoculo. I residui sono all'interno del range di validazione in tutti i campioni di rene, mentre in tutti gli altri campioni i residui sono inferiori a LLOQ, in due campioni di pelle+grasso erano addirittura inferiori al Limite di Determinazione (LOD).

I residui di marbofloxacina in tutti gli animali del gruppo D, campionati 8 giorni dopo la somministrazione, sono inferiori agli MRL e, più precisamente inferiori ai valori di LLOQ e di LOD del metodo analitico.

#### Conclusioni sullo studio di residui

*Lo studio è stato condotto in conformità alle GLP. Il numero e le caratteristiche degli animali sono risultati appropriati per la valutazione del profilo di deplezione residuale e risultano conformi alle linee guida europee di riferimento. Gli animali sono stati correttamente trattati e la metodica di somministrazione ha garantito l'assunzione della dose prevista di 8 mg di marbofloxacina/kg p.v.*

*Il campionamento del sito d'inoculo è stato effettuato conformemente alla linea guida EMEA/CVMP/542/03-Final. Non sono state evidenziate alterazioni dello stato di salute degli animali durante il trattamento, né di organi e tessuti durante il campionamento. Il metodo di analisi in HPLC/MS/MS utilizzato per la quantificazione dei residui di marbofloxacina nei tessuti di suino è stato convalidato e confermato idoneo risultando anche robusto e ripetibile. I risultati ottenuti dopo somministrazione di 8 mg di marbofloxacina/kg p.v. in singola somministrazione (equivalente a 2 ml/25 kg p.v. di Masterflox 10 – Fatro S.p.A.) mostrano un profilo di deplezione rapido del principio attivo soprattutto in muscolo e fegato, dove i livelli residuali iniziano ad essere inferiori agli MRL già dopo 4 giorni dalla somministrazione. L'organo di maggiore accumulo è il rene a conferma del ruolo principale che questo riveste nell'eliminazione di marbofloxacina.*

*Un recente studio di cinetica residuale (Yang et al., 2017) condotto in 40 suinetti di 8 settimane di età somministrando una singola dose di 2,5 mg di marbofloxacina/kg p.v. per via intramuscolare, ha evidenziato concentrazioni ematiche e tessutali di principio*



### *Capitolo 3 Studi Sperimentali*

*attivo già a partire dalle 2 h fino alle 96 h post somministrazione. Le concentrazioni più elevate sono state raggiunte in sito d'inoculo, rene, muscolo e polmone, che sono risultate maggiori rispetto a quelle ematiche.*

*Questi dati unitamente ai risultati ottenuti nel presente studio residuale e cinetico confermano che marbofloxacin dopo somministrazione intramuscolare nel suino è rapidamente assorbita e diffonde bene nei tessuti raggiungendo concentrazioni rilevanti già dopo poche ore.*

### 3.3.2. Tollerabilità nella specie di destinazione

Per valutare se la dose one-shot di 8 mg di marbofloxacin/kg p.v. che si è dimostrata efficace nello studio clinico (vedi paragrafo 3.2.1.) sia anche sicura per l'animale, sono state condotte valutazioni sperimentali approfondite di tollerabilità locale e generale durante tutti gli studi sperimentali condotti. I risultati sono riassunti di seguito.

- **Tollerabilità generale e locale nello studio *in vivo* di farmacocinetica**

Nella prova sperimentale GLP di farmacocinetica sono stati utilizzati 18 suini (9 maschi e 9 femmine) ibridi commerciali, di circa 5 mesi di età e peso compreso tra i 52,5 e i 70,0 kg, clinicamente sani. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi di 6 animali ciascuno che differivano per la dose somministrata:

- il Gruppo A - 6 mg /kg p.v.
- il Gruppo B - 8 mg /kg p.v.
- il Gruppo C - 10 mg /kg p.v.,

Le somministrazioni sono state eseguite nella regione del collo ed il sito d'inoculo è stato cerchiato con apposito marcatore per animali per valutare eventuali reazioni locali.

I suini hanno ricevuto un'iniezione del medicinale veterinario in commercio (Masterflox 10 - Fatro S.p.A.) con volumi di inoculo da 3,30 a 3,90 ml nel Gruppo A, da 4,20 a 4,80 ml nel Gruppo B e da 5,50 a 7,00 ml nel Gruppo C.

Durante tutta la prova sono state effettuate osservazioni cliniche con esami obiettivi generali per monitorare lo stato di salute dei soggetti. È stata inoltre effettuata una valutazione di tollerabilità locale e generale 1, 2, 3, 12, 24 e 48 ore post trattamento.

La tollerabilità generale è stata valutata sulla base dell'osservazione clinica dello stato di salute, dell'appetito e del comportamento. La tollerabilità locale è stata apprezzata tramite palpazione ed esame visivo del sito d'inoculo per evidenziare l'eventuale comparsa di edema, dolore, calore, irritazione o infiammazione.

#### **Risultati**

*Durante tutto il periodo di osservazione non è stata rilevata alcuna alterazione dovuta alla somministrazione dei tre dosaggi. Tutti gli animali hanno mantenuto buone condizioni di salute e costanti assunzioni di cibo e acqua. In nessun animale trattato a*

*qualunque dosaggio è stata rilevata alcuna alterazione come ponfi, edemi o indurimenti al sito d'inoculo.*

- **Tollerabilità generale e locale nello studio in vivo di deplezione residuale**

Nello studio GLP di deplezione residuale sono stati utilizzati 20 suini magroni, 10 maschi e 10 femmine, ibridi commerciali, di circa 5 mesi di età e tra i 50,0 e i 63,0 kg di peso vivo.

Tutti i suini hanno ricevuto una dose singola di 8 mg di marbofloxacin/ kg p.v. nella regione del collo. Sulla base del peso vivo di ogni soggetto il volume di prodotto utilizzato (Masterflox 10 – Fatro S.p.A.) corrispondente alla dose per chilo di peso vivo era compreso 4,00 e 5,04 ml.

Durante tutto il periodo di prova sono state effettuate osservazioni cliniche per stabilire il buono stato di salute dei soggetti in prova. E' stata inoltre condotta una valutazione della tollerabilità locale e generale durante la somministrazione e 1, 2, 3, 12, 24 e 48 ore dopo il trattamento al fine di evidenziare qualunque alterazione dovuta alla somministrazione del prodotto. La tollerabilità locale è stata apprezzata tramite palpazione ed esame visivo del sito d'inoculo per evidenziare l'eventuale comparsa di edema, dolore, calore, irritazione o infiammazione.

#### **Risultati**

*Tutti gli animali sono risultati clinicamente sani, non sono state rilevate alterazioni dello stato di salute, dell'assunzione di cibo e di acqua, come pure del comportamento in generale. I siti d'inoculo durante e dopo la somministrazione non hanno mostrato alcuna alterazione. Anche durante il campionamento nessuna alterazione macroscopica è stata evidenziata in alcun organo o tessuto prelevato.*

- **Tollerabilità generale e locale nello studio clinico**

Nella prova clinica di campo in GCP sono stati arruolati 131 suini affetti da patologia respiratoria. Gli animali, maschi e femmine, ibridi commerciali di circa 4 mesi e con un peso variabile da 32,8 e 50,9 kg sono stati trattati con una dose singola di 8 mg di marbofloxacina/kg p.v. (Masterflox 10 – Fatro S.p.A.). Durante lo studio i suini sono stati visitati il giorno della somministrazione e dopo 1, 2, 3, 4, 7 e 10 giorni per valutare le condizioni di salute e possibili alterazioni anche non imputabili alla patologia in corso.

La valutazione della tollerabilità al sito d'inoculo è stata eseguita 5 e 9 ore dopo la somministrazione e quotidianamente nei 10 giorni successivi con il seguente sistema a punteggio:

1. sito d'inoculo non visibile
2. sito d'inoculo visibile, < 1,5 cm di diametro con zona di eritema cutaneo, Nessuna evidenza di irritazione,
3. gonfiore del sito d'inoculo, 1,5 – 5,0 cm di diametro con o senza eritema cutaneo, gonfiore sottocutaneo e intramuscolare visibile. Può esserci irritazione da sfregamento occasionale del sito d'inoculo,
4. gonfiore del sito d'inoculo, > 5,0 cm di diametro con gonfiore sottocutaneo o intramuscolare accompagnato da evidente irritazione da sfregamento persistente. Il sito d'inoculo può essere di colore rosa o rossastro. Può avere o non avere essudati.

### **Risultati**

*I risultati ottenuti indicano una buona tollerabilità di marbofloxacina alla dose di 8 mg/kg p.v.) in singola somministrazione (equivalente a 2 ml/25 kg p.v. di Masterflox 10 – Fatro S.p.A.) in quanto non è stata rilevata alcuna alterazione allo stato di salute imputabile al trattamento. Anche i siti d'inoculo di tutti gli animali non hanno presentato segni di reazioni.*

### Conclusioni e discussione sulla tollerabilità

*La valutazione della tollerabilità locale e generale effettuata negli studi in vivo di farmacocinetica, residui e studio clinico evidenzia che la dose one-shot di 8 mg marbofloxacin/kg p.v. somministrata per via intramuscolare con una soluzione al 10 % di principio attivo è ben tollerata dai suini. Non vi sono state alterazioni ai siti d'inoculo a conferma che la concentrazione di principio attivo e la quantità di inoculo non hanno causato problemi.*

*In conclusione tutte le valutazioni condotte hanno attestato la buona tollerabilità della dose intramuscolare one-shot di 8 mg/kg p.v..*

### 3.3.3. Ecotossicità

La valutazione dell'impatto ambientale ha lo scopo di evidenziare eventuali effetti dannosi che l'impiego dei medicinali veterinari può determinare sull'ambiente individuando le eventuali misure preventive atte a ridurre tale rischi.

Questa valutazione prevede due fasi successive di studio:

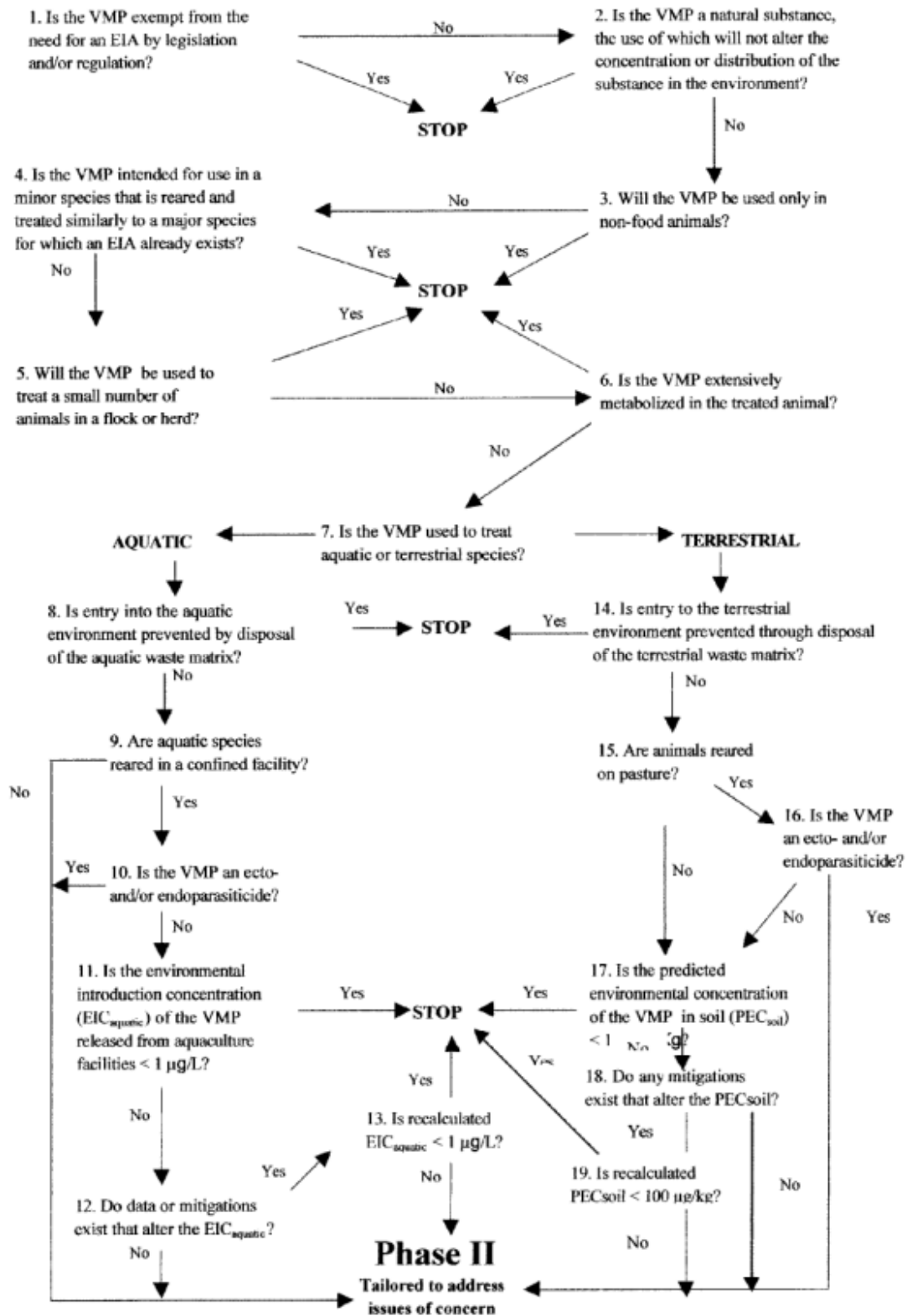
- FASE I, nella quale è valutata la possibile esposizione ambientale ad un dato prodotto (considerando i principi attivi ed eventuali metaboliti). In base al risultato ottenuto in questa fase può essere necessario procedere con la
- FASE II con la quale sono forniti ulteriori dati, oppure vengono condotti studi sperimentali per una ulteriore valutazione del rischio ambientale (FASE IIA), in caso di rischio elevato sono richiesti studi specifici sulla flora e fauna ambientale (FASE IIB).

La valutazione di ecotossicità è stata effettuata in conformità alle Linee Guida Europee di riferimento CVMP/VICH/592/98-FINAL *“Guideline On Environmental Impact Assessment (Eias) For Veterinary Medicinal Products-Phase I”* e EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev. 1 *“Revised Guideline On Environmental Impact Assessment For Veterinary Medicinal Products- in support of the VICH guidelines GL6 and GL38”*.

Di seguito è riportata la valutazione dell'impatto ambientale di marbofloxacin condotta per la specie di destinazione (suino) dopo la somministrazione di una dose one-shot di 8 mg/kg p.v..

In base alla posologia indicata ed alle caratteristiche del principio attivo si segue un *“Decision Tree”* per la valutazione del rischio ambientale (Figura 7).

Figura 7 - Valutazione di FASE I - "Decision Tree" (CVMP/VICH/592/98-FINAL).



### Capitolo 3 Studi Sperimentali

Il calcolo è effettuato per il principio attivo marbofloxacin nella specie di destinazione, suini, alla dose indicata (8mg /kg p.v.).

Come indicato dalla Linea Guida EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1 il calcolo della  $PEC_{soil}$  (Predicted Environmental Concentration) per l'allevamento intensivo viene eseguito mediante l'applicazione della seguente formula:

$$PEC_{soil} = \left[ \frac{D \times Ad \times BW \times P \times 170 \times Fh}{1500 \times 10000 \times 0,05 \times Ny \times H} \right] \times 1000$$

*Dove:*

*PEC<sub>soil</sub> : Predicted Environmental Concentration nel suolo (µg/kg)*

*D: dose giornaliera di principio attivo (mg/kg/die)*

*Ad : numero di giorni di trattamento (giorni)*

*BW: peso vivo dell'animale (kg )*

*P: percentuale di turnover degli animali (posto/anno)*

*170: limite EU di azoto per lo spargimento (Kg N/ha)*

*Fh: Frazione di animali trattati (valore tra 0 e 1)*

*1500: densità media del suolo (Kg/m<sup>3</sup> )*

*10000: area di un ettaro (m<sup>2</sup>/ha)*

*0,05: profondità di aratura (m)*

*Ny: azoto prodotto in un anno (KgN posto/anno)*

*H: fattore relativo al ricovero degli animali (1 per gli animali che stazionano in stalla per tutto l'anno; 0,5 per gli animali che vi stazionano 6 mesi)*

*1000: fattore di conversione (1000 µg/mg)*

Il calcolo della  $PEC_{soil}$  è effettuato inserendo per il calcolo i valori dei singoli parametri indicati nella linea guida EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1.



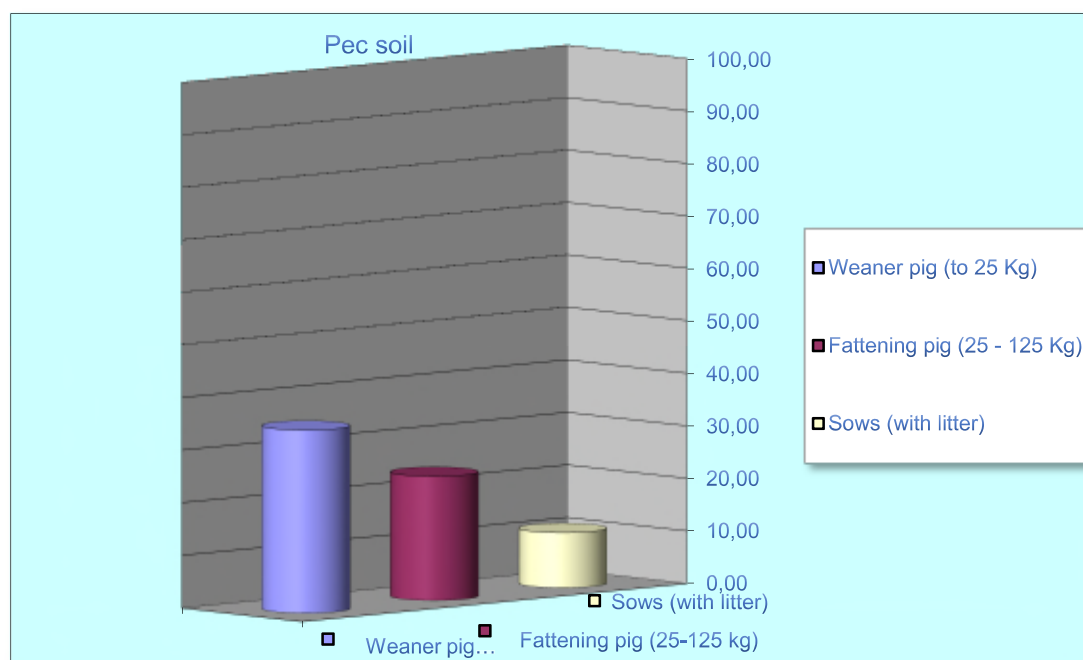
### Capitolo 3 Studi Sperimentali

In Tabella 33 e in Figura 8, sono riportati i risultati ottenuti dal calcolo della  $PEC_{soil}$  in seguito alla somministrazione singola di 8 mg di marbofloxacina/kg p.v. nelle diverse categorie di suini.

Tabella 33 -  $PEC_{soil}$  di marbofloxacina per il suino

MARBOFLOXACINA - $PEC_{soil}$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
Allevamento intensivo		
SUINI	Weaner pig	34,76
	Fattening pig	23,57
	Sows (with litter)	8,37

Figura 8 -  $PEC_{soil}$  di marbofloxacina alla dose di 8 mg/kg p.v. nei suini



#### Conclusioni e discussione sull'Ecotossicità

I risultati confermano che la valutazione di Ecotossicità si ferma in FASE I, in quanto i valori di  $PEC_{soil}$  di marbofloxacina, calcolati nella specie suina, risultano ampiamente inferiori a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , limite fissato dalla Linea Guida Europea, affinché il rischio di esposizione dell'ambiente al medicinale veterinario in seguito al trattamento di animali da produzione animale sia da ritenersi trascurabile. La dose di 8 mg di marbofloxacina /kg p.v. in singola somministrazione non determina effetti dannosi sull'ambiente in conformità alle linee guida europee di riferimento.

### Riferimenti bibliografici

**Craig G.A e Gudmundsson S. (1996)** – “The postantibiotic effect” In: Lorian V. (Ed.). Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th Edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore MD, pg 296-329.

**de Jong A., Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I., Butty P., Klein U., Marion H., Rigaut D., Valle M. (2014)** - “Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath Study” – Vet. Microbiol., 172, pg, 202-215

**Decreto Legislativo 26/2014** –“Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”, (14G0036) GU n 61 del 14/03/2014

**Ding H., Li Y., Chen Z., Rizwan-ul-HAQ M., Zeng Z. (2010)** - “Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular and oral single-dose application in pigs”, J. Vet. Pharmacol. Ther. 33, pg. 507-10

**Direttiva 2010/63/UE (2010)** del parlamento europeo e del consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici GU dell’Unione europea n. L 276/33

**Direttiva 86/609/CEE (1986)** del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici GU n. L358

**Dorey L., Hobson S., Lees P. (2017)** - “Potency of marbofloxacin for pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*: comparison of growth media” - Res, Vet, Sci,, 111, pg, 43-48vil

**Dvorchik BH, (1982)** –“Drug disposition during pregnancy” Int J Biol Res Pregnancy 3:10-3,

**EMA (2000)** - VICH Topic GL 9 (GCP) Guideline on good clinical practice, CVMP/VICH/595/98-FINAL 1-30

**EMA (2003)** - “Guideline on injection site residues” - EMEA/CVMP/542/03 FINAL.

**EMA (2011)** - “Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal Products”, EMEA/CVMP/016/00-Rev.2

**EMA (2015)** VICH GL48: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in foodproducing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods - EMEA/CVMP/VICH/463199/2009

**EMA (2015)** VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in foodproducing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies - EMEA/CVMP/VICH/463202/2009

**EMEA (2000)** -"Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAS) for Veterinary Medicinal Products-Phase I" CVMP/VICH/592/98-FINAL

**EMEA (2000)** - Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in the target animal species, EMEA/CVMP/133/99-FINAL

**EMEA (2008)** "Revised Guideline On Environmental Impact Assessment For Veterinary Medicinal Products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38" EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1

**European Union (2005)** Volume 8 – Notice to applicants and Guideline, Veterinary medicinal products - Establishment of Maximum Residue Limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.

### Capitolo 3 Studi Sperimentali

**Klein U., Homas V., De Jong A., Simjee S., Moyaert H., Siegwart E., El Garch F., Butty P., Marion H., Rigaut D., Haag S., Diergarten S., Richard-Mazet A. (2015)** “Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012” VetPath Poster

**Klein U., de Jong A., Moyaert H., El Garch F., Leon R., Mazet A.R., Rosem., Maes D., Pridmore A., Thomson J.R., Ayling R.D. (2017)** - “Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe” – Vet. Microbiol., 204, pg. 188-193

**NCCLS (1997)** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standard—M31-T

**Regolamento (CE) n. 470/2009 (2009)** del Parlamento europeo e del Consiglio, che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale. GU dell’Unione europea n. L152/11

**Regolamento (UE) n. 37/2010 (2010)** concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale G.U. n. L15/1 dell’Unione europea

**Schneider M., Paulin A., Dron F., Woehrlé F. (2014)** “Pharmacokinetics of marbofloxacin in pigs after intravenous and intramuscular administration of a single dose of 8 mg/kg: dose proportionality, influence of the age of the animals and urinary elimination”. J. Vet. Pharmacol. Ther. 37, pg. 523-30

**Vilalta C., Giboin H., Schneider M., El Garch F., Fraile L. (2014)** - “Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of marbofloxacin in the treatment of *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in nursery and fattener pigs using Monte Carlo simulations” – J. Vet. Pharmacol. Ther., 37, (6), pg. 542-549

**Yang F., Liu Y., Li Z., Wang Y., Liu B., Zhao Z., Zhou B., Wang G. (2017)** “Tissue distribution of marbofloxacin in pigs after a single intramuscular injection”. J. Vet. Sci. 18, pg. 169-73

## *Capitolo 4*

# *Conclusioni*

## CONCLUSIONI

L'uso dei fluorochinoloni negli animali produttori di derrate alimentari è stato identificato come una delle aree di preoccupazione a causa della possibile trasmissione all'uomo di resistenza a questo gruppo di antimicrobici anche attraverso la catena alimentare.

L'approccio *One Health* messo in atto dai principali Organismi mondiali impone al settore veterinario un uso prudente e responsabile di antibiotici ed in particolar modo di fluorochinoloni.

Oltre ad un minor utilizzo è richiesto anche un approccio terapeutico che permetta di far fronte alle necessità cliniche, ma che al tempo stesso limiti al massimo la possibile insorgenza e diffusione di antibiotico resistenza.

La marbofloxacinina è un principio attivo sviluppato per la veterinaria caratterizzato da una elevata attività battericida.

La conoscenza delle caratteristiche farmacologiche di questa sostanza antimicrobica nella specie animale bersaglio e la sua azione su patogeni target ha consentito l'ottimizzazione delle strategie di dosaggio per l'uccisione batterica e per ridurre al minimo l'insorgenza di resistenza antimicrobica.

Nel panorama dell'antibiotico resistenza la filiera suinicola è tenuta in stretta osservazione, sia per le tecniche di allevamento sia per la numerosità di capi/anno allevati, ma anche per la produzione e consumo di carne/procapite.

Pertanto proprio per la specie suinicola si è voluto individuare un nuovo approccio terapeutico per il trattamento delle più comuni patologie sensibili a marbofloxacinina e cioè le sindromi respiratorie.

Le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche di marbofloxacinina sono ampiamente conosciute sia a livello bibliografico che sperimentale. Le MIC di marbofloxacinina, ottenute da fonti bibliografiche e da prove sperimentali forniscono un quadro completo ed aggiornato sulla sensibilità dei tre principali patogeni causa di malattie respiratorie nel suino: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*. I valori di MIC<sub>90</sub> sono rispettivamente pari a 0,0313 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,0313 µg/ml.

Il profilo cinetico di marbofloxacin nel suino ottenuto applicando un'analisi non compartimentale ai dati conseguiti in uno studio condotto somministrando 3 diversi dosaggi del fluorochinolone in unica somministrazione one-shot (6 mg/kg p.v., 8 mg/kg p.v. e 10 mg/kg p.v.), ha dimostrato che con l'aumentare del dosaggio è rilevabile un aumento proporzionale dei valori di concentrazione massima ( $C_{max}$ ), ma non dei valori di area sotto la curva ( $AUC_{inf}$ ).

Questo potrebbe essere dovuto ai processi di eliminazione che sono descritti dalla fase discendente della curva concentrazione-tempo. Infatti, nel gruppo di animali trattati con la dose di 10 mg/kg, si può osservare una più rapida diminuzione delle concentrazioni ematiche di marbofloxacin legata probabilmente ad una più veloce eliminazione. Pertanto la perdita di linearità non sembra garantire un proporzionale aumento dell'efficacia con dosi superiori a 8 mg/kg p.v..

La correlazione PK/PD, ottenuta raggruppando i parametri più appropriati per i FLQ ( $C_{max}/MIC$  e  $AUC_{0-24h}/MIC$ ), pur considerando a scopo cautelativo la  $MIC_{90}$ , hanno dato risultati molto soddisfacenti soprattutto per i dosaggi di 8 mg/kg e 10 mg/kg, risultando superiori ai valori ottimali considerati come efficaci, nei confronti dei patogeni respiratori del suino.

Va anche aggiunto che il dosaggio di 8 mg/kg p.v. garantisce concentrazioni significative fino a 84 ore, offrendo maggiori garanzie nell'ambito del naturale decorso temporale delle patologie sostenute dai microrganismi considerati (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*).

La prova clinica di campo ha confermato l'efficacia della dose di 8 mg/kg con la guarigione di suini con sindrome respiratoria infettati naturalmente (*Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*).

Relativamente al profilo di sicurezza della dose one-shot, lo studio residuale ha confermato una cinetica di eliminazione di marbofloxacin relativamente veloce. L'organo di maggior accumulo con livelli residuali maggiori è risultato essere il rene, organo principalmente coinvolto nella eliminazione del principio attivo.

Durante tutti gli studi in vivo effettuati per le diverse finalità è stata sempre valutata la tollerabilità locale e generale al trattamento con marbofloxacin. Nello specifico la dose one-shot di 8 mg/kg per via intramuscolare non ha evidenziato alterazioni dello stato generale di salute di tutti gli animali trattati.

Da un punto di vista ambientale per il comparto terrestre ed acquatico, la valutazione di ecotossicità ha permesso di confermare l'assenza di restrizioni all'uso della posologia one-shot di 8 mg/kg p.v..

In conclusione sulla base dei risultati ottenuti si può affermare che il dosaggio one-shot di 8 mg di marbofloxacin/kg p.v. nel suino è un approccio terapeutico sicuramente efficace per il trattamento della sindrome respiratoria sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* e si dimostra sicuro per la specie target, per l'uomo consumatore di derrate alimentari e per l'ambiente. Questo approccio può essere considerato da prediligere rispetto al dosaggio classico di 2 mg di marbofloxacin/kg p.v. per 3 -5 giorni in considerazione della possibile minor incidenza di insorgenza e diffusione di fenomeni di resistenza.