

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO DI SANITÀ PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA

CICLO XXIV

## **VALUTAZIONE DELL'IMPIEGO DI ANTIBATTERICI NELL'ALLEVAMENTO DEL TACCHINO DA CARNE**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Massimo Morgante

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Mauro Dacasto

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Clara Montesissa

**Dottorando:** Dott.ssa Elisa Russo



Il progetto di ricerca della seguente tesi di dottorato è stato finanziato dalla Regione del Veneto nell'ambito dei progetti cofinanziati dal Fondo Sociale Europeo 2007/2013.

Codice Progetto: 2105/1/ 48/1017/2008

Titolo: Aspetti innovativi della ricerca su salute animale e sicurezza alimentare nel territorio regionale.

Codice Intervento: 1

Titolo dell'intervento: Metodologie per la valutazione dell'adeguatezza delle posologie e dei tempi di sospensione di antibatterici autorizzati nell'allevamento avicunicolo.

Negli anni successivi la denominazione del progetto FSE è diventata:

Nel 2010

Codice progetto: 2105/101/1/722/2009

Titolo: Creazione di professionalità elevate di livello dottorale nelle aree delle scienze di base e dell'ingegneria, delle scienze della vita e delle scienze umane e sociali seconda annualità.

Codice Intervento: 25

Titolo dell'intervento: Metodologie per la valutazione dell'adeguatezza delle posologie e dei tempi di sospensione di antibatterici autorizzati nell'allevamento avicunicolo.

Nel 2011

Codice progetto: 2105/101/2/722/2009

Titolo: Creazione di professionalità elevate di livello dottorale nelle aree delle scienze di base e dell'ingegneria, delle scienze della vita e delle scienze umane e sociali terza annualità.

Codice Intervento: 25

Titolo dell'intervento: Metodologie per la valutazione dell'adeguatezza delle posologie e dei tempi di sospensione di antibatterici autorizzati nell'allevamento avicunicolo.



# Indice

Indice.....	1
Riassunto .....	5
Abstract .....	9
1. Introduzione.....	13
1.1 Allevamento intensivo del tacchino da carne .....	13
1.1.1 Allevamento avicolo in Italia.....	13
1.1.2 Ciclo produttivo intensivo del tacchino da carne .....	15
1.1.3 Organizzazione e gestione dell'allevamento intensivo del tacchino da carne.....	16
1.1.4 Gestione del fotoperiodo .....	16
1.2 Utilizzo di antibatterici nell'allevamento avicolo .....	17
1.2.1 Fluorochinoloni .....	20
1.2.2. Fenicoli.....	22
1.3 Antimicrobico-resistenza .....	24
1.3.1 Meccanismi di antibiotico-resistenza .....	25
1.3.2 Meccanismi di insorgenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza ...	26
1.3.3 Sistemi di valutazione della sensibilità batterica agli antibatterici ..	28
1.4 Studi di farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD) .....	31
1.5 Patologie respiratorie .....	34
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	34
1.5.2 <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> .....	38
1.5.3 <i>Metapneumovirus</i> Aviare.....	40
2. Studio PK/PD e verifica dei tempi di sospensione della terapia con Enrofloxacin per la colibacillosi nel tacchino da carne.....	41
2.1 Scopo del lavoro.....	41
2.2 Scelta e validazione dei metodi analitici per la determinazione e quantificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina negli studi di cinetica e di deplezione dei residui .....	42
2.2.1. Materiali e metodi .....	42

2.2.2. Risultati .....	48
2.2.3. Discussione .....	58
2.3. Efficacia della posologia autorizzata dell'Enrofloxacin con somministrazione mediante acqua di bevanda.....	58
2.3.1. Materiali e metodi dello studio di farmacocinetica .....	59
2.3.2. Risultati dello studio di farmacocinetica .....	61
2.3.3. Materiali e metodi dello studio di farmacodinamica .....	65
2.3.4. Risultati dello studio di farmacodinamica .....	65
2.3.5. Analisi dei risultati mediante un modello PK/PD .....	66
2.3.6. Discussione .....	67
2.4. Verifica dell'adeguatezza del tempo di sospensione stabilito per l'Enrofloxacin.....	71
2.4.1. Materiali e metodi.....	71
2.4.2. Risultati .....	72
2.4.3. Discussione .....	73
2.5. Discussione e conclusioni .....	75
3. Studio della cinetica e dell'efficacia del Florfenicolo a diverse posologie e condizioni ambientali .....	77
3.1. Scopo del lavoro .....	77
3.2. Validazione del metodo analitico .....	77
3.2.1. Materiali e metodi.....	78
3.2.2. Risultati .....	82
3.2.3. Discussione .....	85
3.3. Studio sperimentale <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> in animali sani .....	85
3.3.1. Materiali e metodi della valutazione di sensibilità <i>in vitro</i> .....	86
3.3.2. Risultati della valutazione di sensibilità <i>in vitro</i> .....	87
3.3.3. Materiali e metodi dello studio di farmacocinetica .....	89
3.3.4. Risultati dello studio di farmacocinetica .....	92
3.3.5. Discussione .....	99
3.4. Studio di efficacia clinica <i>in vivo</i> .....	102

3.4.1. Materiali e metodi .....	103
3.4.2. Risultati .....	106
3.4.3. Discussione .....	109
3.5. Discussione e conclusioni.....	112
4. Conclusioni.....	115
5. Bibliografia.....	121



## Riassunto

Gli antibatterici nell'allevamento avicolo sono largamente utilizzati e vengono somministrati per via orale mediante solubilizzazione del principio attivo in acqua di abbeverata. Questo sistema non è invasivo e permette di trattare un elevato numero di animali contemporaneamente riducendo i costi, ma non prevede il controllo individuale delle quote di farmaco assunto, quindi la terapia potrebbe non essere somministrata in modo uniforme a tutto il gruppo. L'assunzione di adeguate quantità di farmaco è condizionata dalla solubilità in acqua del farmaco e dalla palatabilità dell'acqua, che può essere modificata dalle elevate concentrazioni del farmaco, e da quei fattori ambientali che possono modificare l'assunzione di acqua da parte degli animali. Tra questi il fotoperiodo, la temperatura e l'umidità del capannone. Le condizioni ambientali e le modalità di somministrazione utilizzate durante le prove sperimentali, possono differire notevolmente da quelle in allevamento e possono essere la causa discrepanze tra le valutazioni di efficacia effettuate durante le fasi sperimentali e l'efficacia in campo (Vermeulen *et al.*, 2001).

Una gestione non corretta del farmaco si riflette in una diffusione del fenomeno dell'antimicrobico-resistenza, oggetto di costante monitoraggio in ambito internazionale sia in medicina umana che veterinaria (Cantón & Morosini, 2011; ECDC & EMEA, 2009). La diffusione di sottopopolazioni batteriche resistenti nelle specie animali destinate al consumo umano è un problema non solo di salute animale, ma anche di salute pubblica, ed è indispensabile contenerlo il più possibile (Aarestrup & Wegener 1999).

Lo scopo degli studi condotti nel triennio del dottorato di ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di alcune terapie antibatteriche condotte nel tacchino in condizioni di campo. Nel primo studio è stata valutata l'efficacia di Enrofloxacin, un fluorochinolone molto utilizzato per la terapia della colibacillosi del tacchino, e nel secondo la nuova applicazione del Florfenicolo per la terapia dell'infezione da *O. rhinotracheale*. In particolare sono state studiate la cinetica e le modificazioni della resistenza batterica nei microrganismi responsabili di patologie dell'apparato respiratorio nei confronti dei due principi attivi.

I) Per valutare l'attuale diffusione di resistenza all'Enrofloxacin, nel 2009 e 2010, sono stati isolati 89 ceppi di APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*) da allevamenti intensivi di tacchini da carne situati in Nord Italia, di cui è stata determinata la MIC. I ceppi resistenti erano il 30,3%, quelli intermedi il 40,5% e quelli sensibili il 29,2%, con valori di MIC<sub>50</sub> e di MIC<sub>90</sub> pari rispettivamente a 1 mg/L e a 32 mg/L.

Dieci tacchini sani e dieci tacchini affetti da una forma sistemica di colibacillosi sono stati trattati con la posologia autorizzata di 10 mg/kg di Enrofloxacin somministrata per os previa dissoluzione in acqua di abbeverata per 10h al giorno per 5 giorni, lo schema di somministrazione maggiormente utilizzato in campo. Durante l'ultimo giorno di trattamento, dagli animali sono stati prelevati i campioni di sangue necessari per la determinazione della cinetica ematica, e le concentrazioni di Enrofloxacin sono state determinate mediante HPLC accoppiata ad un rilevatore di tipo fluorimetrico. L'analisi dei parametri cinetici ottenuti mediante lo studio delle curve concentrazione-tempo di tutti gli animali quali area sotto la curva (AUC 7374,53 ± 1067,64 h·ng/mL e 7656,95 ± 1460,61 h·ng/mL) e concentrazione massima (C<sub>max</sub> 673,09 ± 186,18 ng/mL e 543,50 ± 68,75 ng/mL) non ha rivelato differenze statisticamente significative tra i gruppi sano e malato.

È stato poi applicato un modello PK/PD per valutare l'efficacia dell'Enrofloxacin dopo somministrazione pulsata in acqua di abbeverata. Il rapporto AUC/MIC<sub>50</sub> (7,37 e 7,66) in entrambi i gruppi determina valori troppo piccoli, fortemente inferiori al *breakpoint* di efficacia adottato in medicina umana e veterinaria per i fluorochinoloni (125).

I risultati ottenuti indicano che il dosaggio autorizzato di Enrofloxacin 10 mg/kg nel tacchino è inefficace nei confronti di più del 70% dei ceppi circolanti di APEC e sottolinea la necessità di un riesame non solo della posologia, ma anche della modalità di somministrazione.

Durante lo stesso studio sette tacchini sani sono stati sacrificati a 3 giorni dal termine del trattamento per verificare l'adeguatezza del tempo di sospensione di 3 giorni previsto per la formulazione adottata. I tessuti edibili previsti per legge sono stati prelevati per la determinazione dei residui di farmaco (muscolo, cute più grasso, fegato e rene). Cinque animali su sette presentavano residui superiori al limite fissato per legge (MRL) in almeno uno

dei tessuti analizzati, quindi il tempo di sospensione applicato sembra non essere adeguato alla posologia e alla via di somministrazione utilizzata.

II) Nel secondo studio è stata valutata l'efficacia *in vitro* del Florfenicolo nei confronti di *O. rhinotracheale*, la cinetica ematica del Florfenicolo somministrato al tacchino, a 15 e 30 mg/kg con acqua di abbeverata per 5 giorni, e la sua efficacia *in vivo* in tacchini infetti.

Nella prima fase sono state determinate le MIC di 39 ceppi di *O. rhinotracheale* isolati in campo e conservati presso la facoltà di Medicina veterinaria dell'Università di Gent nei confronti di Florfenicolo: i valori ottenuti per MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> erano rispettivamente pari a 1 mg/L e 1 mg/L.

Nella seconda fase è stata selezionata la dose efficace con le prove di farmacocinetica condotte in tacchini da carne sani trattati con 15 o 30 mg/kg *die* di Florfenicolo a diverse condizioni ambientali con somministrazione continua del farmaco in acqua di abbeverata per 5 giorni. Durante l'ultimo giorno di trattamento, da tutti gli animali sono stati prelevati i campioni di sangue necessari per la determinazione delle concentrazioni ematiche di Florfenicolo mediante LC-MS.

La prima prova di cinetica a 15 mg/kg è stata effettuata sottoponendo gli animali ad un fotoperiodo di 20h di luce e 4h ore di buio e cibo *ad libitum*. L'analisi delle curve concentrazione-tempo e i parametri ottenuti, AUC (6778,23 ± 2275,67 h·ng/mL) e C<sub>max</sub> (818,03 ± 214,13 ng/mL), ha rivelato che la dose 15 mg/kg è insufficiente ad avere efficacia terapeutica.

La prova di cinetica a 30 mg/kg è stata condotta su tre gruppi di animali sani sottoposti a due fotoperiodi diversi (20h luce e 4h di buio o 16 ore di luce e 8h di buio) con il cibo sempre a disposizione o con il cibo a disposizione dopo 1h dall'accensione della luce.

I valori di AUC (18583,65 ± 2962,02 h·ng/mL 22883,64 ± 5305,72 h·ng/mL 21964,03 ± 2192,78 h·ng/mL) e C<sub>max</sub> (1717,46 ± 34,99 ng/mL 1995,71 ± 631,45 ng/mL 1680,89 ± 114,73 ng/mL) ottenuti con la dose 30 mg/kg si sono rivelati potenzialmente efficaci. Tra i tre gruppi trattati con 30 mg/kg di Florfenicolo a differenti condizioni ambientali, solo la curva concentrazione-tempo del gruppo sottoposto al fotoperiodo 20h luce 4h buio ha evidenziato un'assunzione irregolare di alimento e quindi di farmaco.

L'assenza nei modelli PK/PD utilizzati, di parametri e di *breakpoint* definiti per i fenicoli, ha reso necessaria la conferma di efficacia *in vivo* con l'infezione sperimentale di tacchini da carne sani con *O. rhinotracheale*. Nella terza fase un gruppo di animali infetti, non trattato con il farmaco, è stato utilizzato come controllo positivo, gli altri tre sono stati trattati con 30 mg/kg *die* di Florfenicolo mediante somministrazione continua con acqua di abbeverata per 5 giorni alle medesime condizioni ambientali utilizzate per gli studi di farmacocinetica. La progressione della patologia veniva valutata sulla base di un punteggio clinico assegnato giornalmente ai tacchini dei quattro gruppi e dei risultati della titolazione batterica dei tamponi tracheali prelevati periodicamente da tutti i tacchini.

I risultati hanno evidenziato che la posologia di 30 mg/kg di Florfenicolo è efficace per il contenimento delle infezioni da *O. rhinotracheale*, ma non è in grado di eradicare il batterio e che la risposta alla terapia è influenzata dal fotoperiodo. Il gruppo sottoposto a 20h di luce e 4h di buio presenta infatti una sintomatologia più grave degli altri e titoli batterici più elevati, probabilmente a causa delle irregolari concentrazioni ematiche del farmaco che, come emerso dallo studio cinetico, sono influenzate dalla irregolare assunzione dell'alimento.

## Abstract

Antibacterials are widely used in avian medicine and they are frequently administered by oral route in drinking water. This route of administration is a non invasive procedure and allow to treat a large number of animals at the same time, reducing time and costs. By contrast it does not allow to control the individual drug intake, thus the therapy could not be administered in a relieved way to the whole animal group. The intake of adequate drug amount is influenced by several environmental factors modifying water consumption as photoperiod, temperature, humidity and also by drug solubility in water and drug concentration, that may alter water palatability. Environmental conditions, dosages and administration routes are strictly controlled during the experimental trials for efficacy evaluation; every changes adopted to treat infections at farms can cause different results of in field efficacy (Vermeulen *et al.*, 2001).

A wrong drug management is one of the main causes of the wide spread antimicrobial-resistance, all over the world, in both human and veterinary medicine, the diffusion of antibacterial resistant microorganisms needs to be continuously monitored (Cantón & Morosini, 2011; ECDC & EMEA, 2009). The spread of resistant bacterial sub-population in food-producing animals is not only a veterinary problem, but it is also a public health worry, and its surveillance is mandatory (Aarestrup & Wegener 1999).

The goal of the present study, carried out in field conditions, was to update the antimicrobial efficacy of two active ingredients Enrofloxacin and Florfenicol by evaluating the resistance pattern of respiratory pathogens (*E. coli* and *O. rhinotracheale*) isolated from meat turkeys and their kinetic behaviour in turkey reared for meat production. The first study was to confirm the efficacy of Enrofloxacin, a fluoroquinolone authorised since 1990 for the treatment of turkey colibacillosis, and the second to study the efficacy of Florfenicol when used for the new therapy of *O. rhinotracheale* infections.

I) The MIC values of 89 strains isolated in 2009 and 2010 were determined to measure the resistance level to Enrofloxacin of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) population in Italian commercial turkey flocks. High-level resistance was observed in the 30.3% of tested strains, while the 40.5% was

intermediate and the 29.2% susceptible; MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were 1 mg/L and 32 mg/L, respectively.

Then to assess the efficacy of Enrofloxacin administered by pulsed medicated water to turkeys following the scheduled protocol adopted at farms a PK/PD approach was applied to the pharmacokinetic parameters obtained from kinetic studies. Ten healthy and 10 colisepticemic turkeys received 10 mg/kg of the drug dissolved in medicated water (at 89 µg/mL and 71 µg/mL, respectively), available for 10 h/day, for 5 days. On the last day of treatment blood samples were collected from all turkeys for 24 h, and serum was analyzed by HPLC with fluorimetric detection. No differences were observed between the two groups AUC values (7374.53 ± 1067.64 h·ng/mL and 7656.95 ± 1460.61 h·ng/mL) and C<sub>max</sub> values (673.09 ± 186.18 ng/mL and 543.50 ± 68.75 ng/mL) were obtained for healthy and ill turkeys, respectively. The PK/PD parameters C<sub>max</sub>/MIC<sub>50</sub> (0.67 and 0.54 for healthy and sick turkeys respectively) and AUC/MIC<sub>50</sub> (7.37 and 7.66) were by far lower than efficacy breakpoint adopted for fluoroquinolones (125).

During the same study, seven healthy animals were sacrificed 3 days after the end of treatment to verify the accuracy of approved withdrawal time. Samples of the edible tissues stated by EU Regulation 2377/90 amended 470/2009 (muscle, skin plus fat, kidney and liver) were sampled to comply with MRL.

In at least one of the sampled tissues, from five out of the seven animals had Enrofloxacin residues higher than the corresponding MRL. Thus the withdrawal time approved seems to be not adequate to the scheduled treatment via medicated water and a reevaluation study is mandatory.

The results of PK/PD study indicate that the authorised 10mg/kg dosage of Enrofloxacin via medicated water is ineffective against more than 70% of circulating APEC and supports the need of a revision of both dosage and treatment schedule.

II) The goal of the second part of the project was to evaluate sensitivity of *O. rhinotracheale* to Florfenicol and to select the effective dosage by study Florfenicol pharmacokinetics after continuous administration in drinking water for 5 days at two different dosages 15 and 30 mg/kg and at different environmental conditions.

Florfenicol is actually authorised in poultry for the treatment of infection caused by *Actinobacillus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, and *Streptococcus spp* (Interchemie, 2011)

The study was developed in three phases. The first one was the evaluation of *in vitro* efficacy of Florfenicol by determining the MICs of 39 *O. rhinotracheale* strains collected from turkey at farms and stored at Gent University; MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 1 mg/L and 1 mg/L, respectively.

During the second phase the pharmacokinetic of Florfenicol administered at 15 mg/kg or 30 mg/kg to healthy turkeys continuously supplied via drinking water for 5 days, was studied, using different environmental conditions.

During the kinetics at 15 mg/kg the turkeys were exposed to a photoperiod of 20h light and 4h dark and food *ad libitum*. The kinetic proof at 30 mg/kg was carried out with three animal groups each at different environmental conditions, two photoperiod (20h light and 4h dark or 16h light and 8h dark) and two feeding schemes (food *ad libitum* for the all day, food *ad libitum* starting 1h after the lighting) were tested. During the last day of treatment, turkeys were blood sampled and Florfenicol concentrations in plasma was determined by LC-MS.

The analysis of time-concentration curves and kinetics parameters AUC (6778.23 ± 2275.67 h·ng/mL) and C<sub>max</sub> (818.03 ± 214.13 ng/mL) revealed that Florfenicol concentrations in plasma never attained the minimum level required to be considered effective, the MIC value of 1 mg/mL.

No significant differences were detected between the three groups treated at 30 mg/kg and exposed at different environmental conditions. AUC values (18583.65 ± 2962.02 h·ng/mL, 22883.64 ± 5305.72h·ng/mL and 21964.03 ± 2192.78 h·ng/mL) and C<sub>max</sub> values (1717.46 ± 34.99ng/mL, 1995.71 ± 631.45 ng/mL and 1680.89 ± 114.73 ng/mL) obtained treating turkeys at 30 mg/kg could be considered effective at all the condition but the concentration-time curve of turkeys held with 20h light and 4h dark pointed out an erratic water and drug intake. The lack of breakpoints defined for florfenicol in the PK/PD model adopted required the confirmation of the dosage by an *in vivo* efficacy experiment.

Thus the third phase was an *in vivo* study starting with the experimental infection of four groups of meat turkeys with *O. rhinotracheale*. One group was

not treated and was considered as positive control, all the other three were treated at 30 mg/kg with the continuous administration of Florfenicol in drinking water for 5 days, and held at different environmental condition as in the pharmacokinetic study.

The animals were scored daily on the basis of clinical examination, and tracheal swabs were collected periodically and titrated for *O. rhinotracheale*.

Results of this study pointed out the dosage of 30 mg/kg of Florfenicol to be effective to hold back *O. rhinotracheale* infection, but not to eradicate the microorganism. The group held at 20h light 4h dark had a worse response to the therapy with higher bacterial title and higher clinical score likely due to irregular blood concentration of the drug as observed during the previous kinetic study.

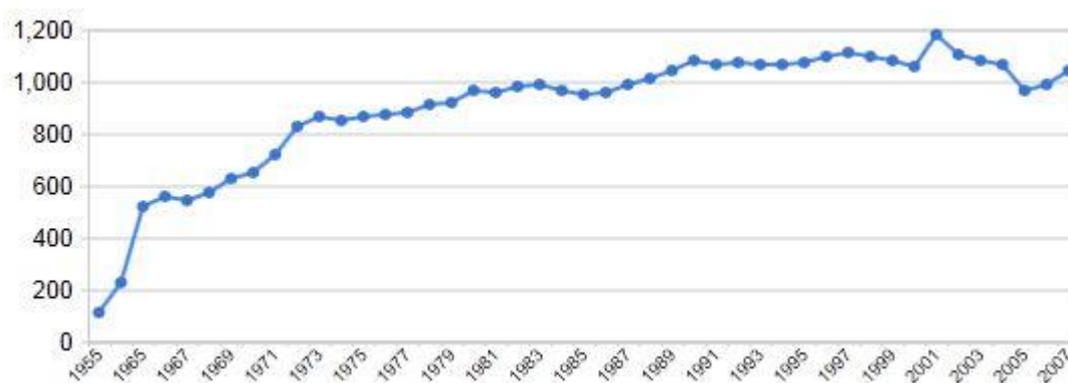
# 1. Introduzione

## 1.1 Allevamento intensivo del tacchino da carne

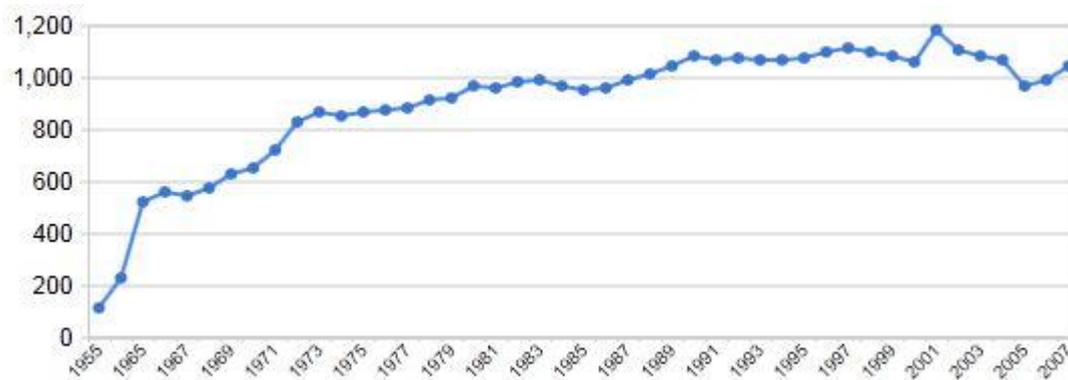
### 1.1.1 Allevamento avicolo in Italia

In Italia l'allevamento avicolo rappresenta un settore importante della zootecnia in continua espansione, come è possibile osservare dalla figura 1.1. L'andamento delle produzioni segue quello dei consumi, che sono andati gradualmente aumentando negli ultimi 40 anni, come mostrato nella figura 1.2.

**Figura 1.1.** Produzione di carni avicole in tonnellate dal 1968 al 2008 (Fonte: UNA, 2011).

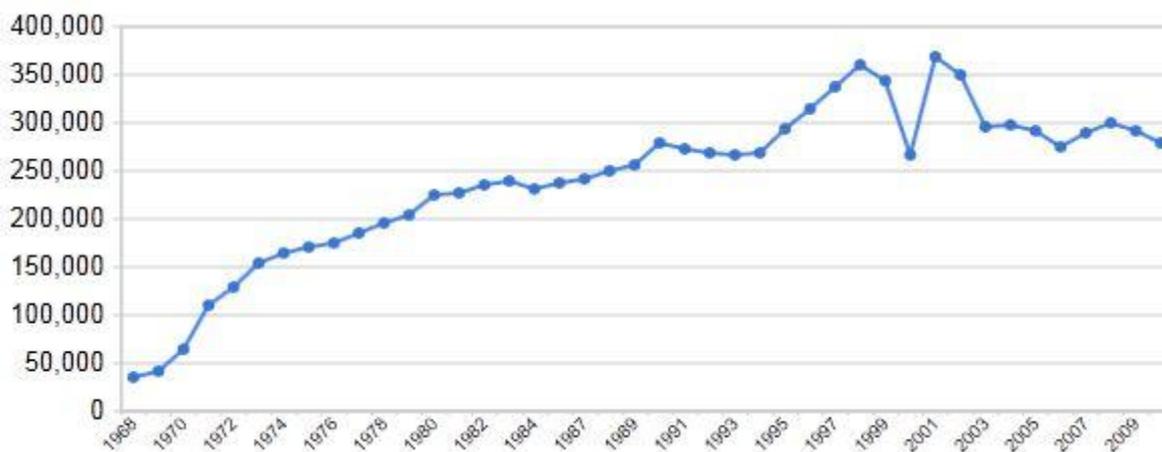


**Figura 1.2** Consumo annuo di carni avicole in tonnellate dal 1968 al 2008 (Fonte: UNA, 2011).



L'andamento delle produzioni delle carni di tacchino si è sviluppato in modo analogo (figura 1.3).

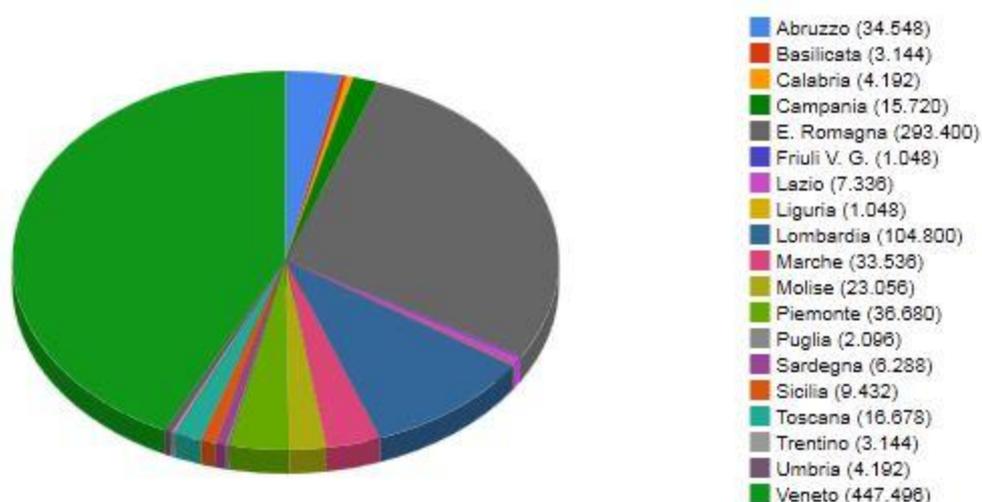
**Figura 1.3** Produzione di carni di tacchino in tonnellate dal 1968 al 2010 (Fonte: UNA, 2011).



L'andamento di tutti i grafici mostra due flessioni negli ultimi 40 anni. La prima flessione nel 1999-2000, più marcata nelle produzioni che nei consumi, corrisponde alla crisi di settore determinata dall'epidemia di influenza aviaria ad alta patogenicità che si è verificata in quegli anni e che ha causato forti perdite animali. Nel 2005 la seconda flessione, dovuta soprattutto ad un calo dei consumi, è stata causata dall'allarmismo suscitato dai media riguardo l'influenza aviaria (UNA, 2011).

La distribuzione territoriale degli allevamenti avicoli mostra che la maggior parte sono concentrati nella pianura padana, nelle cosiddette DPPA (*Densely Populated Poultry Area*), cioè in aree geografiche ben definite in cui la densità di avicoli allevati è estremamente alta. Queste aree sono localizzate in Veneto (provincia di Verona) e in Lombardia (provincia di Brescia). In queste due regioni si concentra il 65% della produzione avicola nazionale, con circa 3.300 allevamenti che ospitano circa 94 milioni di capi (figura 1.4).

**Figura 1.4** Produzione di carni avicole in tonnellate per le diverse regioni per l'anno 2005 (Fonte: UNA, 2011).



### 1.1.2 Ciclo produttivo intensivo del tacchino da carne

In Italia la produzione industriale interessa prevalentemente tacchini superpesanti, i maschi vengono macellati a 19 settimane con un peso vivo di 19-20 kg, mentre le femmine vengono macellate a 14 settimane con un peso vivo di 8,5-9 kg (Guidobono Cavalchini, 2008).

La prima fase di allevamento del tacchinotto è quella più delicata. Dopo il sessaggio in incubatoio, i tacchinotti di un giorno, tutti dello stesso sesso, vengono portati in capannone. Per i primi 15 giorni vanno riscaldati con lampade e contenuti in cerchi per evitare l'allontanamento dalle lampade. In questo periodo è normale un contenuto tasso di mortalità (1%).

Superati i 50-60 giorni di vita non sono necessari accorgimenti particolari. È solo necessario regolare settimanalmente l'altezza di mangiatoie e abbeveratoi e utilizzare un mangime correttamente bilanciato in funzione del sesso e dell'età degli animali. Una volta raggiunto il peso previsto i tacchini vengono macellati tutti lo stesso giorno.

Questo sistema permette di applicare il cosiddetto "tutto pieno tutto vuoto", un sistema sanitario che prevede un periodo di vuoto di almeno tre settimane in cui vengono effettuate pulizie e disinfezioni. In questo modo eventuali problemi infettivi di un ciclo non dovrebbero ripercuotersi nei cicli successivi (Guidobono Cavalchini, 2008).

Da un punto di vista sanitario uno dei problemi principali sono le coccidiosi. Tutti i cicli di allevamento dispongono di un programma di trattamento farmacologico o di uno vaccinale per il controllo delle coccidiosi. Problemi di natura batterica sono generalmente conseguenti ad uno stato di stress degli animali e tendono a verificarsi in allevamenti gestiti male o in corrispondenza di eventi stressanti quali le vaccinazioni (Löhren *et al.*, 2008).

### **1.1.3 Organizzazione e gestione dell'allevamento intensivo del tacchino da carne**

Le produzioni avicole in Italia hanno carattere prevalentemente intensivo e sono organizzate in filiere fortemente integrate. L'allevamento di polli e tacchini da carne è gestito con un contratto di soccida tra la filiera e l'allevatore. Tale contratto prevede che la filiera fornisca mangime, animali e assistenza tecnica e sanitaria, l'allevatore è proprietario esclusivamente delle strutture e, a fine ciclo, percepisce una retribuzione variabile in funzione dell'indice di conversione degli animali (Giacomini, 2005).

Gli animali che vengono forniti dalla filiera all'allevatore sono ibridi commerciali, risultato di una forte selezione di diverse linee genetiche pure incrociate per sfruttare il fenomeno di eterosi o vigore dell'ibrido (Marelli, 2008).

I tacchini da carne vengono allevati a terra, su lettiera, in capannoni a pianta rettangolare larghi 14-16 metri e di lunghezza variabile. Il capannone è chiuso con illuminazione artificiale e ventilazione forzata. La densità degli animali non dovrebbe superare i 35 kg/peso vivo/m<sup>2</sup> che si traduce in media in 3 capi/m<sup>2</sup> per i maschi e 6 capi/m<sup>2</sup> per le femmine (Guidobono Cavalchini, 2008).

### **1.1.4 Gestione del fotoperiodo**

Nella gestione degli allevamenti avicoli l'illuminazione è un fattore di grande importanza non solo per i suoi effetti sulla regolazione dell'attività riproduttiva, ma anche perché la lunghezza del fotoperiodo e l'intensità luminosa influenzano i cicli sonno veglia, il consumo di cibo, la velocità di crescita e l'indice di conversione degli animali (Lewis & Morris, 2006).

Se da un lato l'aumento di luminosità e l'aumento di ore di luce incrementano il consumo di cibo, dall'altro alterano il comportamento dell'animale e ne innalzano il livello di stress, sono quindi parametri che vanno attentamente

valutati. Nell'allevamento intensivo del tacchino da carne il fotoperiodo viene adeguato in modo da massimizzare l'indice di conversione degli animali e la velocità di accrescimento.

Santos *et al.* già nel 1997 riportavano una possibile influenza del fotoperiodo sulla cinetica dei farmaci somministrati in acqua di abbeverata, in particolare per i parametri AUC (area sotto la curva) e  $C_{max}$  (concentrazione al picco della curva farmacocinetica). L'abbeverata segue cicli periodici e presenta un picco poco prima del periodo di buio; questo schema sembra influenzare soprattutto i farmaci con semivita breve, perché presentano un veloce decadimento delle concentrazioni ematiche. Quando l'intervallo di tempo prima della successiva assunzione di farmaco è troppo ampio (es: interruzione notturna dell'abbeverata), lo stato stazionario non viene raggiunto.

## **1.2 Utilizzo di antibatterici nell'allevamento avicolo**

Gli antibatterici nell'allevamento avicolo sono sempre stati largamente utilizzati; le cause di patologia negli avicoli sono per lo più di natura infettiva e vanno trattate con opportuni antimicrobici. Tra le principali patologie ci sono: colibacillosi, aereosacculiti, infezioni da *Staphylococcus spp.*, onfaliti, coccidiosi e infezioni da *Mycoplasma gallisepticum* (Tanner, 2000).

Attualmente l'impiego dei farmaci è autorizzato solo a scopo terapeutico e metafilattico.

Fin dagli anni '40 era noto che l'aggiunta di quantità subterapeutiche di antibatterico nel mangime destinato ad animali in allevamento favoriva la crescita e migliorava l'indice di conversione; per lungo tempo gli antibatterici sono stati usati non solo a scopo terapeutico, ma come promotori di crescita. L'utilizzo di elevate quantità di antibatterici ha portato, negli anni, allo sviluppo di resistenza verso numerose classi di antibatterici. Questo ha determinato sia un problema di sanità animale, causa la riduzione drastica di farmaci efficaci disponibili in corso di patologie sostenute da batteri, sia un problema di sanità pubblica, in quanto gli animali così trattati diventano una potenziale fonte di zoonosi sostenute da batteri resistenti. In seguito a questo allarme, già a partire dagli anni '90, l'Unione Europea ha bandito l'uso degli antibatterici promotori di crescita (Castanon, 2007).

Attualmente gli antibatterici possono essere utilizzati per la terapia a seguito di diagnosi effettuata da un medico veterinario.

I farmaci possono essere somministrati singolarmente ad ogni individuo oppure a gruppi di animali.

Il 90% dei farmaci utilizzati per la terapia in avicoltura sono somministrati per via orale, tramite acqua medicata o mangime medicato effettuando una terapia di massa. Questo permette di trattare un elevato numero di animali contemporaneamente con diversi vantaggi tra cui: il costo ridotto in termini di tempo e personale e l'assenza di modalità invasive che comportano lesioni tissutali o stress per gli animali. Gli svantaggi sono dovuti al fatto che con questa via di somministrazione l'assunzione di adeguate quantità di farmaco è condizionata da numerosi fattori. Il primo, più importante, riguarda la corretta distribuzione del farmaco nel mezzo: nell'alimento è necessaria una corretta miscelazione per ottenere una distribuzione omogenea del farmaco, in acqua bisogna valutare la solubilità e i fattori che la possono influenzare, come la durezza dell'acqua e il pH. Inoltre l'acqua non è in grado di mascherare il sapore e l'odore del farmaco e la sua solubilizzazione, a concentrazioni elevate, può ridurre la palatabilità dell'acqua. Il fotoperiodo, come già visto, può influenzare l'assunzione di farmaco. Infine, ma non meno importante, la terapia di massa non prevede il controllo individuale dell'assunzione del farmaco quindi il principio attivo potrebbe non essere somministrato in maniera adeguata a tutto il gruppo. Da questo punto di vista l'acqua medicata presenta meno problemi rispetto al mangime, gli animali malati riducono l'ingestione di cibo molto prima di ridurre il consumo di acqua, tuttavia molti fattori ambientali (temperatura, umidità del capannone) possono influenzare il consumo di acqua e cibo. Per evitare errori di dosaggio va monitorata la quantità di acqua bevuta quotidianamente dal gruppo di animali in trattamento prima dell'inizio della terapia e va stabilita sulla base del peso e del consumo di acqua la concentrazione di farmaco nell'acqua di abbeverata idonea a garantire il successo della terapia (Vermeulen *et al.*, 2001).

Per effettuare una terapia sicura ed efficace negli avicoli sono necessarie un numero notevole di informazioni relative alla farmacodinamica del principio attivo e agli aspetti farmacocinetici della formulazione nella specie di destinazione, ma vanno anche considerate le condizioni di utilizzo del principio

attivo in allevamento. La notevole differenza tra le condizioni ambientali in cui vengono tenuti gli animali nelle prove sperimentali e in allevamento, e le diverse modalità di somministrazione, durante la terapia sperimentale e quella in allevamento, possono comportare una diversa efficacia in campo.

L'utilizzo del farmaco nelle specie da reddito è regolamentato per legge, le sostanze impiegate negli animali in produzione devono infatti dimostrarsi sicure non solo per la specie a cui vengono somministrate, ma anche per il consumatore. A questo scopo per tutti i principi attivi utilizzati nelle specie allevate per la produzione di alimenti per l'uomo devono essere definiti dei Limiti Massimi Residuali (LMR) per specie e per tessuto considerato. Pertanto per ciascuna preparazione medicinale contenente il principio attivo in esame deve essere fissato un tempo di sospensione, ossia il tempo minimo che deve decorrere dal termine del trattamento alla macellazione nel caso delle carni, o prima della commercializzazione dei prodotti nel caso di latte o uova (Regolamento (CEE) N. 2377/90 del Consiglio del 26 giugno 1990; Regolamento (CE) N. 470/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009; Regolamento (UE) N. 37/2010 della Commissione del 22 dicembre 2009).

Le principali classi di antibatterici impiegati nell'allevamento avicolo sono sulfamidici, penicilline, polipeptidi, lincosamidi, cefalosporine e chinoloni. I sulfamidici, una delle classi più vecchie, sono spesso utilizzati in associazione con il Trimetoprim per aumentarne l'efficacia senza aumentare la tossicità. Le penicilline vengono generalmente impiegate per la terapia delle clostridiosi e di altre patologie batteriche; le più usate in avicoltura sono Amoxicillina e Ampicillina, che hanno lo svantaggio di essere poco stabili quando sono in sospensione in acqua di abbeverata. I polipeptidi sono efficaci nei confronti dei gram positivi e tra i più utilizzati ci sono Colistina e Polimixina E. Le cefalosporine danno risultati eccellenti contro batteri sia gram positivi che gram negativi, ma devono essere considerate antibatterici di terza scelta per la grande importanza che rivestono in medicina umana. Nella classe dei chinoloni quelli più utilizzati in medicina veterinaria sono i principi attivi di seconda generazione, che si adattano molto bene all'utilizzo in avicoltura perché altamente solubili e stabili in acqua. Recentemente anche i fluorochinoloni sono stati riconsiderati e ora sono classificati come antibatterici

di terza scelta per evitare di ridurre l'efficacia in medicina umana, dove rivestono un ruolo importante (Löhren *et al.*, 2008).

### **1.2.1 Fluorochinoloni**

I fluorochinoloni sono un gruppo di agenti antibatterici di sintesi derivati dall'Acido Nalidixico, il capostipite dei chinoloni. Questo gruppo di farmaci presenta eccellente attività battericida verso batteri gram negativi (tra cui *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Pasteurella spp*, *Proteus spp*, *Salmonella spp* e *Pseudomonas aeruginosa*), alcuni batteri gram positivi (tra cui *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*), micoplasmici, micobatteri e clamidie (Anonimo, 2003).

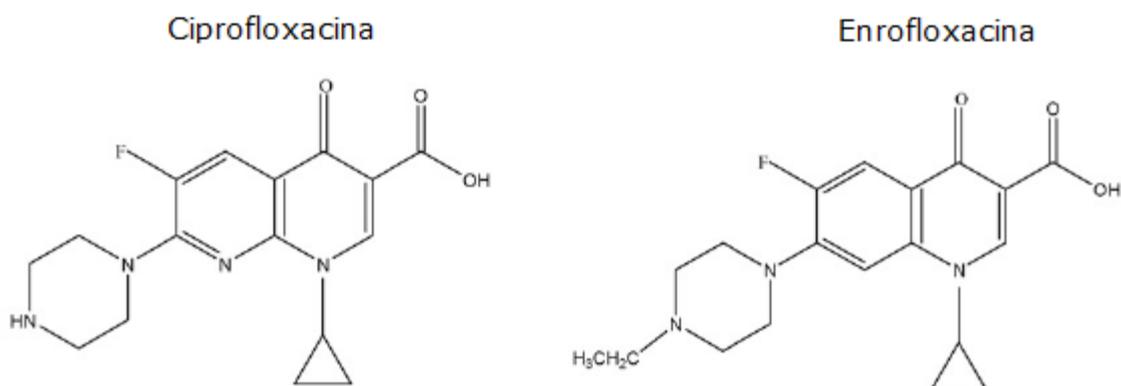
Il meccanismo d'azione attraverso cui agiscono i fluorochinoloni è l'inibizione della subunità A dell'enzima DNA girasi e della subunità C dell'enzima topoisomerasi IV. Il risultato è una attività battericida già a basse concentrazioni di farmaco. La DNA girasi è un enzima intracellulare, ma i fluorochinoloni entrano nella cellula grazie alla loro lipofilia e alla presenza delle porine. L'elevata concentrazione intracellulare che i fluorochinoloni possono raggiungere sembra responsabile dell'effetto post antibiotico che perdura per 4-8 ore dopo il termine del trattamento. È probabile che l'esposizione del batterio al farmaco ne riduca le capacità di aderenza alle cellule (Brown, 1996).

I chinoloni vengono frequentemente classificati in 3 generazioni. La prima generazione è rappresentata dai primi principi attivi immessi in commercio, tra cui l'Acido Nalidixico, l'Acido Ossolonico e il Cinoxacin; queste molecole sono abbastanza polari, presentano scarsa biodisponibilità, scarsa distribuzione tissutale e sono efficaci nei confronti dei gram positivi ma presentano uno spettro ridotto nei confronti dei gram negativi. La seconda generazione comprende Norfloxacin, Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Marbofloxacina, Danofloxacin, Difloxacina, Norfloxacin, Enoxacin, Orbifloxacina, Levofloxacina, Sparfloxacina e Grepafloxacina; questo gruppo di farmaci presenta delle modifiche strutturali che forniscono maggiore biodisponibilità orale e migliore distribuzione tissutale, lo spettro d'azione è più ampio e comprende *Enterobacteriaceae* e altri microrganismi gram negativi come *P. aeruginosa* e alcuni cocci gram positivi. La terza generazione è rappresentata

da Trovafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Gemifloxacin e Sitafloxacin; questo gruppo di farmaci mantiene le caratteristiche positive della generazione precedente e amplia lo spettro d'azione nei confronti dei gram positivi, batteri anaerobi e micobatteri. Sotto l'aspetto cinetico mostrano ottima biodisponibilità dopo somministrazione via orale e un tempo di emivita piuttosto lungo (Ball, 2000; Martinez *et al.*, 2006).

L'Enrofloxacin (figura 1.5) è un fluorochinolone di seconda generazione registrato esclusivamente per l'utilizzo in medicina veterinaria. Dopo la somministrazione questo farmaco viene parzialmente N-dealchilato in sede epatica formando Ciprofloxacin (figura 5), una molecola attiva registrata come antibatterico in medicina umana (Brown, 1996).

**Figura 1.5** Formula chimica di struttura di Ciprofloxacin ed Enrofloxacin (Christodoulou *et al.*, 2007).



Nel 2005 la US Food and Drug Administration (FDA) ha vietato l'uso di Enrofloxacin nelle specie da reddito negli Stati Uniti d'America, in seguito ad alcuni studi che hanno attribuito l'insorgenza e la diffusione di resistenza ai fluorochinoloni in *Campylobacter spp.*, al loro utilizzo in medicina veterinaria.

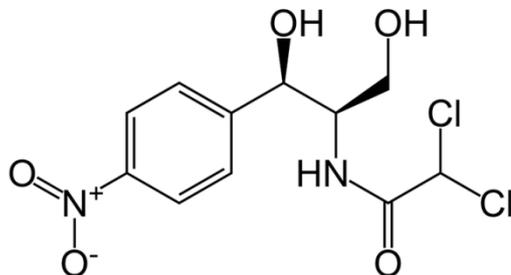
In Europa è approvato l'uso di Enrofloxacin in numerose specie sia da affezione (cane, gatto) che da reddito (pollo, tacchino, coniglio, maiale, bovino, pecora, capra), in particolare nelle specie avicole questa molecola viene comunemente impiegata per il trattamento della colibacillosi (Lutful Kabir, 2010). Le autorizzazioni per l'utilizzo del farmaco nelle specie da reddito risalgono alla fine degli anni '80; in molti casi sono state seguite procedure di

registrazione nazionali, quindi non sono uniformi tra i diversi paesi comunitari (EMEA, 2006). Per questo nel 2010 l'European Medicine Agency (EMA) ha stabilito la necessità di armonizzare sul territorio europeo l'utilizzo dei farmaci veterinari contenuti chinoloni o fluorochinoloni per le specie da reddito, incluso il tacchino. Attualmente in Italia il farmaco è autorizzato per il trattamento degli avicoli in corso di: salmonellosi, colibacillosi, pasteurellosi, micoplasmosi, mal rossino del tacchino, corizza contagiosa e stafilococchi; il dosaggio registrato è di 10 mg/kg/die per via orale in acqua di abbeverata (ad orientamento 50 mL della soluzione al 10% diluiti in 100 L di acqua di bevanda) per 3-5 giorni con un tempo di sospensione di 3 giorni (Bayer, 2007).

### 1.2.2. Fenicoli

Il capostipite dei fenicoli è il Cloramfenicolo (figura 1.6).

**Figura 1.6** Formula chimica di struttura del Cloramfenicolo (modificato da Spoo & Riviere, 1999).



Il Cloramfenicolo, originariamente isolato dal terreno di crescita dello *Streptomyces venezuelae*, viene oggi prodotto per sintesi chimica. È un antibatterico con uno spettro d'azione molto ampio, efficace nei confronti di una grande varietà di batteri gram positivi e gram negativi, aerobi ed anaerobi, clamidie micoplasmi e rickettsie (Schwartz *et al.*, 2004).

Il meccanismo d'azione attraverso cui agisce è l'inibizione della sintesi proteica, legandosi alla subunità 50S dei ribosomi blocca l'azione della peptidil-transferasi, impedendo la costruzione della catena aminoacidica (Anonimo, 2003; Singer *et al.*, 2004).

Il Cloramfenicolo ha azione batteriostatica, la sua struttura lipofila gli permette di attraversare facilmente le membrane cellulari e le barriere ematiche concentrando anche in distretti difficili da raggiungere quali il SNC, le vie urinarie e l'occhio (Spoo & Riviere, 1999).

Questo farmaco causa però notevoli effetti tossici, in primo luogo perché i ribosomi dei mammiferi sono molto simili a quelli batterici, e in particolare le cellule del midollo osseo risentono dell'azione dell'antibatterico che può causare una inibizione dose dipendente dei precursori degli eritrociti e più raramente aplasia del midollo osseo (Spoo & Riviere, 1999).

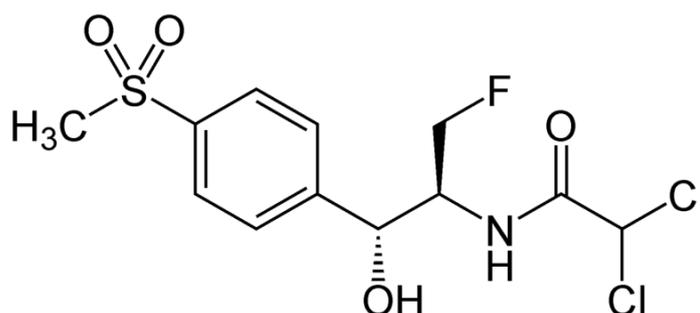
A causa dei suoi effetti tossici, e dell'impossibilità di definire un valore soglia di tossicità e quindi un LMR, l'uso di questo antibatterico negli animali da reddito è stato vietato nel 1994 in Europa; preparazioni per uso topico sono tuttora impiegate nelle specie da affezione (Schwartz *et al.*, 2004).

La tossicità del Cloramfenicolo risiede nella presenza di un nitro gruppo, eliminandolo sono stati sintetizzati due nuovi antibatterici meno tossici, entrambi autorizzati in medicina veterinaria: il Tiamfenicolo e il Florfenicolo (Spoo & Riviere, 1999).

Il Tiamfenicolo presenta lo stesso meccanismo d'azione del Cloramfenicolo, in vitro ha uno spettro d'azione simile, ma la sua struttura chimica ne modifica le caratteristiche farmacocinetiche. Essendo meno lipofilo del Cloramfenicolo risulta meno tossico, ma anche meno efficace causa una distribuzione minore nell'organismo (Spoo & Riviere, 1999).

Il Florfenicolo ha una struttura simile al Tiamfenicolo con l'aggiunta di un atomo di fluoro che rende la molecola più lipofila (figura 1.7).

**Figura 1.7** Formula chimica di struttura del Florfenicolo (modificato da Spoo & Riviere, 1999).



Non presenta effetti tossici a livello midollare e la sua efficacia in vitro è uguale se non maggiore rispetto a quella di Cloramfenicolo e Tiamfenicolo. Il farmaco distribuisce bene nei tessuti, raggiunge attivo le vie urinarie e il latte, ma non penetra facilmente fino al SNC, dove raggiunge concentrazioni inferiori a quelle del Cloramfenicolo. Data la scarsa tossicità di questa molecola e la sua efficacia essa si presenta come un'ottima alternativa al Cloramfenicolo per gli animali da reddito (Spoo & Riviere, 1999).

L'uso del Florfenicolo in medicina veterinaria è stato approvato nell'Unione Europea per il controllo delle patologie respiratorie nei bovini (1995) e nei suini (2000), e negli USA per il trattamento delle pododermatiti infettive (flemmone interdigitale) sostenute da *Fusobacterium necrophorum* e *Bacterioides malenigenicus* del bovino. L'utilizzo per il trattamento delle foruncolosi da *Aeromonas salmonicida* nei salmonidi è un impiego diffuso e in fase di autorizzazione in Europa (Schwartz *et al.*, 2004).

Attualmente non ci sono prodotti a base di Florfenicolo registrati per l'utilizzo negli avicoli in Italia, ma l'EMA ha stabilito gli LMR per gli avicoli già nel 2002 per il Florfenicolo (100 µg/ml per il muscolo, 200 µg/ml per cute e grasso, 2000 µg/ml per il fegato e 300 µg/ml per il rene) ed esso è già in commercio in altri paesi per il trattamento di patologie enteriche e respiratorie causate da microorganismi sensibili come *Actinobacillus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, e *Streptococcus spp* negli avicoli, con un tempo di sospensione di 7 giorni (Interchemie, 2011).

### **1.3 Antimicrobico-resistenza**

Secondo la definizione della WHO l'antimicrobico-resistenza è "la resistenza di un microorganismo ad un farmaco antimicrobico al quale era precedentemente sensibile. Gli organismi resistenti (che includono batteri, virus e alcuni parassiti) sono in grado di resistere agli attacchi dei farmaci antimicrobici, come antibatterici, antivirali, e antimalarici, quindi le terapie standard diventano inefficaci, le infezioni persistono e si possono diffondere. L'antimicrobico-resistenza è conseguenza dell'uso, ed in particolare dell'uso improprio, di farmaci antimicrobici e si sviluppa quando un microorganismo muta o acquisisce geni di resistenza." (WHO, 2011).

Il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza è ormai estremamente diffuso, e costantemente monitorato a livello mondiale sia in medicina umana che veterinaria. Già nel 2001 la Commissione Europea aveva presentato un documento in cui si prefiggeva di sviluppare gli aspetti di sorveglianza, prevenzione, cooperazione internazionale, ricerca e sviluppo di nuovi antimicrobici, per cercare di arginare il fenomeno (ECDC & EMEA, 2009).

Nello stesso anno e con lo stesso scopo il Consiglio dell'Unione Europea aveva emanato una raccomandazione sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina umana (Council recommendation 2002/77/EC). Negli anni successivi sono state molte le iniziative dedicate al monitoraggio del livello di resistenza agli antimicrobici presenti nelle diverse popolazioni di patogeni in medicina umana e veterinaria e allo studio dei loro meccanismi di resistenza alle diverse classi farmacologiche. Queste iniziative sono state affiancate da altre volte a educare medici umani e veterinari ad un uso più responsabile del farmaco allo scopo di ridurre la selezione dei microorganismi resistenti (ECDC & EMEA 2009).

I risultati del piano di monitoraggio condotto dall'EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) nei paesi comunitari iniziato nel 2002 e tutt'ora attivo, confermano che i batteri che presentano i maggiori livelli di resistenza sono *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. È stato stimato che nel 2007 le infezioni sostenute da ceppi resistenti di queste 5 specie batteriche nell'uomo abbiano causato 25000 morti, 2,5 milioni di giorni di ricovero extra e un aumento delle spese sanitarie ospedaliere di circa 900 milioni di euro. Considerando la somma dei costi precedenti, dei costi relativi anche alle cure effettuate a casa e del costo delle giornate lavorative perse, la perdita economica stimata è di 1,5 bilioni di euro l'anno (ECDC & EMEA 2009).

### **1.3.1 Meccanismi di antibiotico-resistenza**

L'antibiotico-resistenza può essere intrinseca, se la specie batterica considerata presenta naturalmente delle caratteristiche che la rendono immune all'attività di un farmaco (es. i Gram positivi non sono sensibili alla Polimixina B che non è in grado di attraversare la loro parete batterica), o

acquisita se parte della popolazione batterica sviluppa una mutazione genetica o acquisisce un gene che le conferisce resistenza verso un certo antimicrobico (Prescott, 2000). L'insorgenza di resistenza può verificarsi tramite una mutazione genetica spontanea, tramite trasferimento di materiale genetico da altri batteri che possiedono un gene di resistenza o tramite amplificazione genica (Pratt, 2002).

I meccanismi di antibiotico-resistenza possono essere di 4 tipi: inattivazione enzimatica o modifica del farmaco, impermeabilità della parete batterica al farmaco, espulsione attiva del farmaco dal batterio tramite pompe di efflusso, alterazione del target del farmaco. Per tutti e 4 i meccanismi la mutazione che conferisce resistenza è solitamente specifica per un certo farmaco. Talvolta si può verificare che un certo tipo di mutazione particolarmente efficace nell'inibire l'azione di un farmaco, riesca ad inibire parzialmente anche altri farmaci della stessa famiglia simili al primo per struttura, in questo caso si parla di resistenza crociata. Quanto più somiglianti sono le strutture chimiche dei farmaci considerati, tanto maggiori sono le probabilità di avere effetti di resistenza crociata tra due o più farmaci (Prescott, 2000).

I fenomeni di resistenza ai fluorochinoloni sono legati a mutazioni del sito target della DNA girasi, a una riduzione della permeabilità delle porine o all'aumento dell'espulsione del farmaco dalla cellula tramite pompe attive di efflusso. Al momento non sono stati riportati meccanismi di degradazione dei fluorochinoloni. Tra i farmaci appartenenti a questa classe si osservano spesso fenomeni di resistenza crociata (Brown, 1996).

I meccanismi di resistenza che interessano i fenicoli sono quattro: la produzione di acetiltransferasi o di nitroreduccasi che inattivano la molecola, la riduzione di permeabilità della parete cellulare batterica e la modifica della subunità 50S dei ribosomi che diventano meno sensibili all'azione del farmaco. La molecola di fluoro presente nel Florfenicolo lo rende meno sensibile di Tiamfenicolo e Cloramfenicolo all'azione dell'acetiltransferasi (Spoo & Riviere, 1999).

### **1.3.2 Meccanismi di insorgenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza**

Come visto nel paragrafo precedente, l'antibiotico-resistenza è un fenomeno dovuto alla presenza di mutazioni genetiche all'interno di una popolazione

batterica. L'insorgenza della mutazione di per sé non è legata all'esposizione al farmaco, ma la presenza del farmaco la rende evidente, poiché solo i batteri che presentano la mutazione sopravvivono all'esposizione e possono replicare. In corso di terapia ciò si traduce con un'iniziale miglioramento del paziente, che corrisponde alla fase in cui la carica batterica viene abbattuta, e con una successiva ricaduta, causata dalla replicazione dei batteri resistenti sopravvissuti alla prima esposizione. Per questa ricaduta il farmaco utilizzato precedentemente risulterà inefficace. In questo senso l'utilizzo del farmaco promuove la diffusione dell'antibiotico-resistenza selezionando progressivamente sempre più sottopopolazioni resistenti (Pratt, 2002).

Il fenomeno di selezione si accentua notevolmente se la terapia viene gestita in maniera scorretta. Innanzitutto, la probabilità che nella popolazione batterica si verifichi una mutazione è tanto più alta quanto più è grande la popolazione, quindi una terapia ritardata, somministrata in una fase più avanzata, con cariche batteriche superiori, comporta rischi maggiori. Durante la terapia la crescita batterica è favorita nel caso di dosi troppo basse o se intercorre troppo tempo tra le somministrazioni (la maggior parte delle terapie antibiotiche prevedono dosi ripetute). Il primo obiettivo da raggiungere quindi per limitare l'insorgenza di questo fenomeno è una corretta gestione della terapia con interventi precoci, farmaci mirati e posologie di somministrazione adeguate (Cantón & Morosini, 2011).

Nel caso specifico della medicina veterinaria, la diffusione di sottopopolazioni resistenti nell'ambito delle specie animali destinate al consumo umano è un problema non solo di salute animale, ma anche di salute pubblica. La selezione di microorganismi resistenti può riguardare gli agenti zoonosici che vengono veicolati con le carni, il latte e le uova, ma anche quei batteri che pur non essendo patogeni per l'uomo possono trasmettere geni di resistenza ad agenti patogeni. Aarestrup e Wegener, (1999) hanno dimostrato che ceppi di APEC (*Escherichia coli* patogeni per gli avicoli ma non per l'uomo) antibiotico-resistenti, che possono contaminare le carcasse avicole, sono in grado di colonizzare l'intestino umano per 10 giorni. Gli APEC non sono patogeni e non danno luogo a nessuna sintomatologia clinica, ma un tempo di permanenza di 10 giorni è sufficiente per la trasmissione dei loro geni di resistenza ad altri organismi patogeni eventualmente presenti nell'intestino dell'uomo.

Il rischio di trasmissione di ceppi resistenti dalle specie in produzione all'uomo aumenta poi esponenzialmente per i soggetti che operano a diretto contatto con gli animali, allevatori, veterinari o macellatori (EFSA, 2011). Van den Bogaard (2001) ha riscontrato l'uniformità tra i pattern di resistenza di *E. coli* isolati da tacchini e allevatori di tacchini, e di quelli isolati da polli, allevatori di polli e macellatori, confermando l'elevato rischio presente per queste categorie lavorative. L'aumento di resistenza batterica nelle specie in produzione ha dunque sicure ripercussioni anche in sanità pubblica.

### **1.3.3 Sistemi di valutazione della sensibilità batterica agli antibatterici**

Per valutare la sensibilità batterica vengono utilizzati diversi metodi *in vitro*: il test di diffusione in piastra (Kirby-Bauer), i test di macrodiluizione e microdiluizione in brodo o in piastra e l'E-test.

Il test di diffusione in piastra o Kirby-Bauer si effettua seminando per spatolamento una opportuna quantità di sospensione batterica pura contenente  $10^8$  cfu/mL in una piastra di agar selezionato sulla base del tipo di batterio da crescere. Una volta seminata la piastra vengono disposti a distanza adeguata dei dischetti imbevuti di antibatterico che diffonderà nell'agar in modo da ottenere concentrazioni di antibatterico più alte vicino al dischetto e decrescenti man mano che ci si allontana. La piastra viene poi incubata in atmosfera e temperatura adeguate al tipo di batterio utilizzato. Dopo un tempo di crescita idoneo sulla piastra si forma una patina batterica uniforme ad eccezione di aree circolari circostanti i dischetti, in cui l'antibatterico ha inibito la crescita, definiti aloni di inibizione. Misurando il diametro di queste aree si può determinare il livello di sensibilità del batterio all'antimicrobico (Winn *et al.*, 2009).

I test per diluizione prevedono la preparazione di un mezzo di crescita batterica (brodo nel caso di micro e macrodiluizione, agar opportunamente scelto in base ai requisiti del batterio da analizzare nel caso delle diluizioni in piastra) a cui vengono addizionate quantità note di antibatterico in modo da ottenere una serie di diluizioni scalari. Nel mezzo viene poi inoculata una quantità nota di batteri e dopo l'incubazione si determina qual è la concentrazione minima di antibiotico presente nel mezzo in grado di inibire la crescita batterica (MIC). La crescita batterica viene considerata positiva sulla

base della torbidità del brodo o della presenza di colonie batteriche sulla superficie dell'agar (Winn *et al.*, 2009).

L'E-test si effettua seminando per spatolamento una opportuna quantità di sospensione batterica pura contenente  $10^8$  cfu/mL in una piastra di agar selezionato sulla base del tipo di batterio da crescere. Una volta seminata la piastra vi viene disposta sopra una striscia graduata di materiale plastico in cui sono presenti delle microbolle con concentrazioni scalari di antibatterico da un estremo della striscia all'altro. Le microbolle a contatto con l'agar si sciolgono determinando un gradiente di concentrazione di antibatterico in tutta la piastra. Dopo l'inoculazione della piastra si otterrà anche in questo caso un alone di inibizione come nel caso del Kirby-Bauer, ma utilizzando la striscia con concentrazione scalari di antibatterico al posto del dischetto si potrà leggere un valore di MIC esatto utilizzando la scala graduata presente sulla striscia (Winn *et al.*, 2009).

I risultati di questi metodi sono affidabili solo se eseguiti seguendo una procedura standardizzata e validata e interpretati correttamente (Schwarz *et al.*, 2010).

A questo scopo questi test vanno eseguiti ed interpretati seguendo procedure standardizzate come quelle proposte dal *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, una volta NCCLS), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), dal *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) o dal *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM). I documenti prodotti da questi organi ufficiali vengono aggiornati periodicamente sia per quanto riguarda le metodiche, che per quanto riguarda i criteri interpretativi e sono volti ad uniformare gli studi condotti dai vari laboratori di ricerca internazionali, in modo da rendere i dati prodotti affidabili e confrontabili. Per questo è necessario seguire scrupolosamente i protocolli forniti nei manuali, sia per quanto riguarda i materiali che per quanto riguarda le procedure. Bisogna inoltre porre molta attenzione alla specie batterica che si vuole analizzare. Le specie batteriche e i farmaci di maggiore interesse sono in genere riportate con i loro specifici protocolli e *breakpoint* nei manuali, ma se si vuole valutare una specie batterica non presente nell'elenco ed utilizzare la tecnica indicata per un'altra, sebbene simile, il valore dei *breakpoint* di sensibilità potrebbe essere errato. Grande importanza rivestono anche i

controlli qualità che vanno sempre compresi nei processi di routine e devono essere effettuati con i ceppi di riferimento indicati dai protocolli (Schwarz *et al.*, 2010).

A questo riguardo il CLSI produce protocolli sia per la medicina umana che per quella veterinaria, includendo numerosi farmaci e patogeni di esclusivo interesse veterinario, che spesso non sono inseriti nei manuali destinati alla valutazione di patogeni umani (Schwarz *et al.*, 2010).

I risultati ottenuti da un test di sensibilità possono essere valutati con due diversi approcci, uno clinico ed uno epidemiologico. Quello clinico valuta se l'utilizzo di una determinata dose di un dato farmaco porterà ad una risoluzione clinica dell'infezione, e inquadra i patogeni in tre categorie: sensibile, intermedio e resistente (la terapia è consigliata solo per ceppi classificati come sensibili). L'approccio epidemiologico serve invece a descrivere la distribuzione e il livello di sensibilità e resistenza all'interno di una certa popolazione batterica, a questo scopo le popolazioni vengono solitamente suddivise in *wild type* (livello di resistenza intrinseca della specie batterica al farmaco) e *non wild type* (livello di resistenza acquisito differente da quello del *wild type* ed in genere superiore) (Schwarz *et al.*, 2010).

La diffusione su piastra è un metodo largamente utilizzato nella diagnostica clinica perché è un test rapido da eseguire, economico, e permette di saggiare contemporaneamente un elevato numero di antimicrobici sullo stesso ceppo batterico con una buona affidabilità nel discriminare tra batteri sensibili, intermedi e resistenti. Per quanto riguarda il suo utilizzo a fini epidemiologici presenta invece dei difetti: la valutazione dei risultati è qualitativa ed influenzata dai criteri di interpretazione utilizzati, non consente invece una valutazione quantitativa esatta e confrontabile con dati provenienti da altri laboratori (Walker, 2000).

Un dato sicuramente più oggettivo e confrontabile si può ottenere con la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) di ciascun ceppo della popolazione batterica selezionata, che può essere eseguito tramite E-test o test per diluizione. Questi test permettono di valutare con una certa esattezza il livello di sensibilità *in vitro* dal punto di vista quantitativo (dato oggettivo), a questo risultato possono essere applicati dei criteri di interpretazione per la successiva classificazione in ceppi sensibili o resistenti o

in ceppi *wild* o *non wild*. Tali dati possono essere facilmente rianalizzati secondo eventuali nuovi criteri (Schwarz *et al.*, 2010). Lo studio delle MIC permette di valutare il pattern di distribuzione della sensibilità batterica, e di suddividere il gruppo analizzato in sottopopolazioni che hanno acquisito diversi gradi di resistenza (es. acquisizione di una mutazione genetica) (Bywater *et al.*, 2006).

Per studiare il livello di resistenza di una certa popolazione batterica sono molto importanti due parametri che vengono ricavati dalle MIC dei singoli ceppi: MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>. La MIC<sub>50</sub> è la concentrazione minima di farmaco in grado di inibire la crescita in vitro di almeno il 50% della popolazione batterica considerata, ed analogamente la MIC<sub>90</sub> è la concentrazione minima di farmaco in grado di inibire la crescita in vitro di almeno il 90% della popolazione batterica considerata. Questi due parametri insieme danno una buona immagine del livello di resistenza acquisito dalla popolazione, ma sono tanto più precisi quanto più la popolazione è ampia, è sconsigliato utilizzarli per popolazioni inferiori ai 30 ceppi. Questi due parametri sono quelli utilizzati negli studi PK/PD per valutare l'efficacia dei farmaci antimicrobici (Schwarz *et al.*, 2010).

Un ulteriore parametro, la cui utilità è però controversa, è la Minima Dose Inibente un mutante *single step* (MPC). Questo parametro è stato proposto in seguito agli studi effettuati sulle modalità di acquisizione di resistenza ai chinoloni. Dato che l'acquisizione di resistenza avviene per mutazioni genomiche *single step* in sequenza è stata misurata *in vitro* la concentrazione necessaria ad inibire la crescita non del ceppo batterico di partenza, ma di quel singolo mutante che presenta la prima mutazione *single step*. Una trattazione più approfondita dell'applicazione di questo parametro verrà fornita nel paragrafo seguente (Zhao & Drlica, 2001).

## **1.4 Studi di farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD)**

Come visto precedentemente, tra le cause di diffusione dell'antimicrobico-resistenza c'è la scorretta gestione del farmaco, e il principale fattore di diffusione è l'esposizione ripetuta a dosi subottimali.

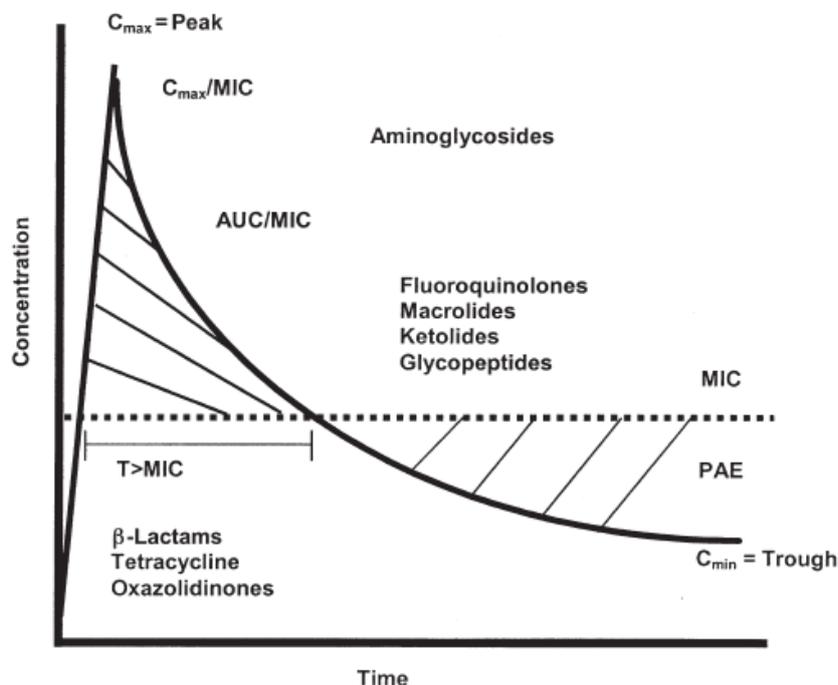
Per definire la dose ottimale di farmaco da somministrare sono stati sviluppati dei modelli che comparano parametri farmacocinetici ottenuti dall'analisi delle curve di concentrazione ematica del farmaco in funzione tempo dopo somministrazione di una dose del farmaco nella specie in esame (farmacocinetica-PK) con le interazioni del farmaco col patogeno ottenute mediante valutazione *in vitro* della MIC (farmacodinamica-PD) (Toutain *et al.*, 2002).

I parametri farmacocinetici più utilizzati sono il tempo di emivita, la concentrazione massima, il tempo al picco di concentrazione, l'area sotto la curva e la biodisponibilità. Il tempo di emivita ( $t_{1/2}$ ) è il tempo necessario affinché la concentrazione plasmatica del farmaco si dimezzi. La concentrazione massima ( $C_{max}$ ) è la concentrazione più alta che il farmaco raggiunge nel plasma. Il tempo al picco di concentrazione ( $T_{max}$ ) è il tempo che intercorre tra la somministrazione e il raggiungimento della  $C_{max}$ . L'area sotto la curva (AUC) corrisponde al valore dell'area compresa tra l'asse temporale e la curva della concentrazione ematica del farmaco in funzione del tempo, e può essere valutata nelle 24h ( $AUC_{0-24}$ ) o fino al punto in cui la curva si sovrappone all'asse temporale ( $AUC_{0-\infty}$ ). La biodisponibilità (F) è un valore percentuale che indica la quota di farmaco che raggiunge il circolo sanguigno in forma attiva (Neubig, 2002).

Per ogni classe di antibatterici la scelta dei parametri farmacocinetici dipende dalle caratteristiche chimiche e dal meccanismo d'azione, al fine di ottenere la migliore correlazione possibile con l'efficacia (Toutain *et al.*, 2002).

In particolare per gli antimicrobici tempo-dipendenti (detti anche concentrazione indipendenti) il parametro classico da considerare è il tempo sopra la MIC ( $T > MIC$ ), cioè il numero di ore in cui la concentrazione ematica del farmaco supera il valore della MIC nelle 24 ore (illustrato in figura 1.8). A questa categoria appartengono la maggior parte di  $\beta$ -lattamici, tetracicline, macrolidi, oxazolidinoni e forse l'associazione Trimetoprim-sulfametossazolo (Rybak, 2006).

**Figura 1.8.** Illustrazione grafica dei parametri farmacocinetici in relazione alla curva della concentrazione ematica in funzione del tempo e antibatterici correlati (Rybak, 2006). ( $C_{max}$  concentrazione massima, AUC area sotto la curva,  $T > MIC$  tempo sopra la MIC, PAE effetto post antibiotico).



Per antimicrobici concentrazione-dipendenti invece vanno considerati i parametri  $C_{max}$  e AUC. In buona parte dei casi i parametri correlano perfettamente tra loro, correlano bene con l'efficacia, e vanno considerati entrambi, ma talvolta possono differire, ed andrà valutato caso per caso quale dei due sia meglio applicare. Appartengono a questa categoria aminoglicosidi che sembrano correlare meglio con la  $C_{max}$ , e chinoloni, glicopeptidi e ketolidi che sembrano invece correlare meglio con l'AUC (Rybak, 2006). In ogni caso è preferibile valutare entrambi i parametri. Diversi studi hanno inoltre riportato che l'incremento dei parametri  $C_{max}$  e AUC aumentando la dose giornaliera e riducendo la durata della terapia determina un aumento di efficacia (Frimodt-Møller, 2002).

Una volta individuato il parametro di interesse si può stabilire l'efficacia terapeutica di un trattamento calcolando il rapporto tra il parametro PK e quello PD. Questo rapporto deve avere un valore minimo (*breakpoint*) al di sotto del quale la terapia viene considerata inefficace. Tale *breakpoint* può risultare differente in funzione del risultato clinico che si vuole raggiungere, del

farmaco e della specie batterica considerata, mentre è quasi ininfluenza la specie animale da trattare. Al fine di minimizzare l'insorgenza di antibiotico-resistenza alcuni autori propongono l'impiego di MPC (*Mutant Prevention Concentration*) al posto della MIC quale parametro farmacodinamico in alcuni protocolli terapeutici (Toutain *et al.*, 2002). Questo nuovo parametro è ampiamente discusso, perché, sebbene teoricamente valido, richiede l'impiego di dosi di farmaco molto elevate, talvolta superiori a quella tossiche, limitandone l'applicabilità (Cantón & Morosini, 2011).

Il problema relativo agli alti dosaggi necessari alla riduzione di insorgenza di antibiotico-resistenza si può ovviare utilizzando associazioni di farmaci che pur presentando un sinergismo dell'azione antibatterica non comportino il cumulo degli effetti tossici, per migliorare l'efficacia e garantire la sicurezza del trattamento farmacologico (Rybak, 2006).

## **1.5 Patologie respiratorie**

Le patologie respiratorie sono tra le principali patologie che colpiscono gli allevamenti intensivi degli avicoli da carne. Tali patologie sono favorite dalle condizioni di allevamento, prima fra tutte l'elevata densità degli animali che facilita la diffusione di malattie infettive e aumenta lo stress degli animali abbassandone le difese immunitarie. Inoltre la scarsa ventilazione dei capannoni determina spesso un elevato livello di ammoniaca nell'aria che danneggia l'epitelio respiratorio favorendo l'insorgenza di patologie respiratorie.

### **1.5.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* è una specie batterica gram-negativa asporigena appartenente alle *Enterobacteriaceae*. È in grado di crescere sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, può variare in forma e dimensione e parecchi ceppi sono mobili e flagellati (Barnes *et al.*, 2008).

Ci sono diversi criteri di classificazione di *E. coli*, il più utilizzato è la suddivisione in sierotipi e si basa sull'identificazione dell'antigene O, di cui esistono 167 varianti antigeniche (Barnes *et al.*, 2008).

*E. coli* è considerato un normale commensale del tratto gastroenterico di mammiferi, uccelli e rettili; negli avicoli è normalmente presente in quantità di  $10^6$  cfu (unità formanti colonia) per grammo di feci. Il 10-15% dei ceppi

presenti in ambito enterico sono potenzialmente patogeni (Barnes *et al.*, 2008).

La colibacillosi negli avicoli è causata da alcuni ceppi di *E. coli* definiti APEC (*Avian Pathogenic Escherichia Coli*). I sierotipi che più frequentemente risultano patogeni sono: O1, O2, O18, O35, O36, O78, O81, O111, O115, O116 e O132, ma sono stati riportati anche altri sierotipi che possono occasionalmente essere patogeni. L'infezione da *E. coli* è generalmente ben controllata dalle difese immunitarie dell'ospite, ma può essere causa di malattia in seguito ad altre infezioni (colibacillosi secondarie), a immunosoppressione, a stress o a una cattiva gestione sanitaria dell'allevamento (Barnes *et al.*, 2008).

La trasmissione del batterio avviene sia per via orofecale che per via verticale attraverso la contaminazione fecale delle uova (Barnes *et al.*, 2008).

Le colibacillosi sono diffuse a livello mondiale e sono considerate una delle maggiori cause di perdite economiche nell'allevamento avicolo (Barnes *et al.*, 2008).

La colibacillosi può presentarsi sotto molte forme in base alla localizzazione dell'infezione; la gravità della patologia è variabile in funzione, tra l'altro, dello stato immunitario dell'ospite e di eventuali altre patologie concomitanti. Una prima distinzione può essere fatta tra forme localizzate e forme setticemiche (Barnes *et al.*, 2008).

Tra le forme localizzate in precisi organi o tessuti le principali sono: onfalite, cellulite, sindrome della testa gonfia (SHS), sindromi diarroiche, vaginite acuta, salpingite, peritonite, orchite, epididimite.

Le forme sistemiche, invece, originano generalmente come forme respiratorie, enteriche o neonatali, vanno poi ad interessare tutto l'organismo, e possono dare sequele in forma di meningite, encefalite, panoftalmite, osteomielite, spondilite, artrite, poliartrite, sinovite, tenosinovite, bursite sternale, pericardite (talvolta associata a fibrosi cronica pericardica), salpingite (forme giovanili). Possono infine causare coligranulomi (Barnes *et al.*, 2008).

Il tipo più comune di colisetticemia è quella di origine respiratoria, che colpisce spesso sia polli che tacchini. Normalmente è secondaria a danneggiamenti della mucosa respiratoria dovuti ad altri agenti infettivi, spesso virali, o a agenti non infettivi, come gli sbalzi termici o livelli elevati di ammoniaca

nell'aria. Tra i principali agenti infettivi ci sono: il virus della bronchite infettiva (IBV), i virus della malattia di Newcastle (NDV) inclusi i ceppi vaccinali, i micoplasmi e il *Metapneumovirus* aviare (aMPV). La gravità delle forme respiratorie è correlata agli altri agenti patogeni presenti e alle difese immunitarie dell'ospite. Le lesioni tendono a concentrarsi nel tratto respiratorio a livello di trachea, polmoni e sacchi aerei, e si presentano generalmente con essudato di tipo caseoso. Nel tacchino in particolare sono comuni polmoniti e pleuropolmoniti. In seguito alle lesioni dei tessuti respiratori il batterio può diffondere causando batteriemia e pericardite. La mortalità si riscontra in genere durante i primi 5 giorni di infezione e presenta livelli variabili, il recupero nei soggetti che riescono a sopravvivere all'infezione iniziale è in genere rapido (Barnes *et al.*, 2008).

La diagnosi viene effettuata isolando *E. coli* dalle lesioni. Grande attenzione deve essere fatta a non contaminare i prelievi con materiale fecale, e la presenza di *E. coli* nei visceri va interpretata con cautela ed in funzione del tempo decorso tra la morte e l'analisi, in quanto gli *E. coli* fecali (AFEC) tendono a colonizzare molto rapidamente la carcassa. L'isolamento viene normalmente effettuato in terreni quali *Mc Conkey agar* o *EMB agar* (Barnes *et al.*, 2008).

Trattandosi di una patologia secondaria il metodo più efficace per combattere la colibacillosi è la prevenzione. Per quanto riguarda gli allevamenti intensivi di tacchini da carne innanzitutto si deve prevenire la trasmissione verticale limitando il più possibile la contaminazione fecale delle uova, con l'utilizzo di metodi di disinfezione (fumigazione, raggi UV, disinfettanti spray) e con una corretta gestione dell'incubatoio (aereazione e rimozione di eventuali uova rotte). All'interno dell'allevamento si deve porre attenzione: alla qualità di acqua e mangime, in quanto possibili fonti di infezione, all'aereazione, per contenere il più possibile il livello di ammoniaca nell'aria, alla presenza di polvere, a non utilizzare lettiere che favoriscano la proliferazione dei coliformi fecali e a ridurre lo stress degli animali.

Diversi sistemi vaccinali sono stati sperimentati ma al momento non sono disponibili vaccini commerciali efficaci (Barnes *et al.*, 2008).

Le colibacillosi vengono trattate con terapie antibatteriche, ma negli ultimi anni il loro trattamento è diventato molto difficile causa il livello di antibiotico-

resistenza sempre più elevato dei ceppi di APEC e AFEC circolanti in campo. Per questo motivo, e per il suo potenziale zoonosico, questo batterio è stato scelto come indicatore in numerosi progetti di monitoraggio di antibiotico-resistenza. L'ultimo report dell'EFSA (2010) sulla sorveglianza dell'antimicrobico-resistenza in Europa riporta dati di resistenza molto elevati per *E. coli* soprattutto nei confronti della Ciprofloxacina, fluorochinolone di seconda generazione autorizzato solo in medicina umana ma fortemente correlato sotto l'aspetto chimico all'Enrofloxacina, a sua volta autorizzata in medicina veterinaria per l'uso negli avicoli. I dati emersi dal report sono illustrati in tabella 1.1. La variabilità dei dati riportati per le diverse nazioni che hanno partecipato al monitoraggio è dovuta in parte alle diverse politiche sanitarie attuate dai differenti paesi e in parte alle linee produttive campionate.

I piani sanitari differiscono in funzione della linea produttiva considerata (nel caso degli avicoli può trattarsi di animali per la produzione di carne, di uova o di riproduttori), determinando differenti pattern di resistenza agli antimicrobici nelle diverse linee e fornendo l'ennesima dimostrazione di come l'utilizzo del farmaco sia importante nell'insorgenza del fenomeno (van den Bogaard *et al.*, 2001).

**Tabella 1.1:** Resistenza (%) a Ampicillina (AMP), Cefotaxime (CFX), Cloramfenicolo (CAF), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GEN), Acido Nalidixico (ANX), Streptomina (STM), sulfamidici (SLF) e tetracicline (TTC) dei ceppi indicatori di *E. coli* isolati nel 2009 da *Gallus gallus*. Il numero di ceppi testati è indicato con N, la nazione è indicata con una sigla: A (Austria), DK (Danimarca), F (Francia), D (Germania), NL (Olanda), PL (Polonia), E (Spagna), N (Norvegia) e CH (Svizzera). Dati ufficiali EFSA (EFSA, 2010)

		A	DK	F	D	NL	PL	E	Totale (7)	N	CH
AMP	% res	33	18	49	39	73	58	71	<b>50</b>	12	21
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
CFX	% res	2	0	3	3	18	11	26	<b>9</b>	0	2
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
CAF	% res	7	0,7	7	7	24	12	19	<b>11</b>	0	4
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
CIP	% res	65	12	35	22	58	62	87	<b>47</b>	-	26
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	-	136
GEN	% res	3	0	0,5	4	9	7	10	<b>5</b>	0	0
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
ANX	% res	63	11	33	21	57	57	84	<b>44</b>	8	24
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
STM	% res	41	9	38	23	67	39	68	<b>40</b>	3	30
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
SLF	% res	38	14	48	39	72	45	54	<b>45</b>	7	27
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136
TTC	% res	26	13	76	25	62	49	75	<b>45</b>	8	25
	N	170	152	189	514	291	356	197	<b>1869</b>	162	136

### 1.5.2 *Ornithobacterium rhinotracheale*

*Ornithobacterium rhinotracheale* è un batterio gram-negativo non mobile, pleomorfo asporigeno appartenente alla superfamiglia V a rRNA. Si tratta di un batterio caratterizzato solo recentemente (1993) e diffuso a livello mondiale (Chin *et al.*, 2008).

Le condizioni ottimali di crescita per questo batterio sono 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub>, in agar addizionato con 5% di sangue di pecora (Chin *et al.*, 2008).

Sono stati identificati 18 sierotipi di *O. rhinotracheale* (da A a R); sebbene non ci siano evidenze di specie-specificità dei diversi sierotipi la maggior parte dei ceppi isolati da polli e tacchini appartengono al il sierotipo A, ma sono stati

effettuati anche isolamenti del sierotipo C in Sudafrica e Stati Uniti (Chin *et al.*, 2008).

Gli ospiti naturali di *O. rhinotracheale* sono una grande varietà di specie aviarie, in cui causa una patologia respiratoria generalmente in associazione con altri patogeni. La gravità della patologia, la durata e la mortalità sono estremamente variabili in funzione del ceppo coinvolto, della presenza di altre infezioni concomitanti e delle condizioni ambientali (gestione dell'allevamento, ventilazione, densità degli animali, condizioni della lettiera, concentrazione di ammoniaca,...) (Chin *et al.*, 2008).

Dai risultati di diversi studi effettuati infettando sperimentalmente diverse specie di avicoli con *O. rhinotracheale*, sembra che questo patogeno sia in grado di dare sintomatologia solo in presenza di un fattore predisponente quale una precedente infezione virale (van Empel & Hafez, 1999). La sintomatologia in questi casi è: depressione, ridotta assunzione di alimento, ridotto incremento ponderale, riduzione dell'ovodeposizione e della qualità delle uova, artrite, osteite, meningite, ma soprattutto sintomi respiratori quali scolo nasale, edema facciale, sinusite, dispnea. In soggetti giovani, in rari casi, può dare morte improvvisa (Chin *et al.*, 2008).

Il controllo delle infezioni da *O. rhinotracheale* viene fatto attraverso misure di biosicurezza, soprattutto in aree ad elevata densità di avicoli. È disponibile un vaccino inattivato iniettabile, ma è poco utilizzato (Chin *et al.*, 2008).

Il trattamento si può effettuare con antibatterici ma bisogna fare molta attenzione alla scelta del principio attivo a causa della resistenza riscontrata negli isolati di campo che risulta molto elevata per parecchie classi di antibatterici, ma anche estremamente variabile (Chin *et al.*, 2008).

Questo dato può essere attribuito al numero relativamente basso di ceppi considerati in molti di questi studi, alla mancanza di un protocollo standardizzato per la determinazione della sensibilità agli antibatterici e soprattutto all'assenza di criteri univoci di classificazione che rendono molto difficile il confronto dei livelli di resistenza riscontrati nei pochi studi a disposizione. Devriese già nel 1995 aveva dimostrato la presenza di ceppi di *O. rhinotracheale* produttori di  $\beta$ -lattamasi, e nel 2001 aveva riportato l'insorgenza di ceppi resistenti a diverse classi di antibatterici nelle popolazioni batteriche circolanti in Belgio. In un lavoro di van Veen *et al.* del 2001 il

pattern di resistenza di ceppi di *O. rhinotracheale* isolati in Olanda era risultato piuttosto preoccupante; su 105 ceppi isolati nel 1999, quelli sensibili a almeno uno dei quattro antibatterici provati (Amoxicillina, Tetraciclina, Enrofloxacin, Trimetoprim-sulfamidico) erano inferiori al 20%. Questi dati sembrano essere confermati da Zaini (2008) che ha valutato il livello di sensibilità a Amoxicillina, Ampicillina, Cloramfenicolo, Doxyciclina, Enrofloxacin, Trimetoprim-sulfamidico, Tilosina, Tilmicosina e tetracicline di 18 isolati Malesi. I risultati ottenuti mostrano una sensibilità del 100% al Cloramfenicolo, ma solo del 17% all'Amoxiciclina e una totale resistenza a tutti gli altri antibatterici. Soriano *et al.* nel 2003 riportano una resistenza del 100% ad Amoxicillina, Enrofloxacin, Ossitetraciclina e Gentamicina in 10 ceppi isolati in Messico. Al momento non sono presenti dati riguardanti la sensibilità di *O. rhinotracheale* ai fenicoli. Con questo quadro di resistenza e in assenza di un test di *screening* per valutare la sensibilità degli isolati di campo di *O. rhinotracheale* prima del trattamento, utilizzabile su ampia scala, la scelta della terapia idonea risulta piuttosto difficoltosa.

### **1.5.3 *Metapneumovirus* Aviare**

Il *Metapneumovirus* aviare (aMPV) è un virus a filamento singolo di RNA appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*. Esistono 4 sottotipi di aMPV: A, B, C e D, con diversa distribuzione territoriale (Gough & Jones, 2008).

Il aMPV può causare nel tacchino diverse sindromi tra cui: la rinotracheite del tacchino (TRT), la sindrome della testa gonfia (SHS) e la rinotrachite aviare (ART). Spesso aMPV non agisce da solo ma fa da agente favorente per patologie batteriche secondarie tra cui *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma gallisepticum* e ceppi lentogeni di virus della malattia di Newcastle (Gough & Jones, 2008).

La sintomatologia è prevalentemente respiratoria con produzione di essudato mucoide, ma la sua gravità dipende sia dagli agenti secondari che dalle condizioni di allevamento, in particolare dalla densità degli animali, dalla ventilazione e dalla quantità di polvere (Gough & Jones, 2008).

## **2. Studio PK/PD e verifica dei tempi di sospensione della terapia con Enrofloxacin per la colibacillosi nel tacchino da carne**

### **2.1 Scopo del lavoro**

L'Enrofloxacin è registrata per la terapia della colibacillosi aviaria con un dosaggio di 10 mg/kg da ottenere con una concentrazione del principio attivo in acqua di abbeverata di 50 µg/mL, tuttavia i dati sui livelli elevati di resistenza di *E. coli* a questo farmaco pongono dei dubbi sulla sua reale efficacia.

In letteratura sono presenti studi di cinetica dell'Enrofloxacin nel tacchino da carne (Dimitrova *et al.*, 2007), ma non ci sono dati relativi alla somministrazione in condizioni di campo, dove fattori quali la via di somministrazione e le condizioni ambientali possono influire, anche pesantemente, sull'efficacia del farmaco e la mancanza di questi dati rende difficile una valutazione di efficacia terapeutica.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il comportamento cinetico dell'Enrofloxacin e la sua efficacia nei confronti di *E. coli* in condizioni quanto più possibile simili a quelle di reale utilizzo, sia in soggetti sani che in soggetti affetti da colibacillosi.

La necessità di rivalutare questo farmaco al dosaggio autorizzato riguardava sia l'efficacia sia la definizione del tempo di sospensione, in quanto quest'ultimo, trattandosi di specie minore, era stato ottenuto per estensione di quello definito per la specie maggiore: il pollo. L'assenza di uno studio di deplezione *ad hoc* nella specie di destinazione per verificare il tempo di sospensione, unito al fatto che questo risulta avere valori diversi nei diversi Paesi Europei, ha suggerito la necessità di effettuarne una verifica. In linea con l'EMA che nel 2010 ha stabilito la necessità di armonizzare l'utilizzo dei farmaci veterinari contenenti chinoloni o fluorchinoloni per le specie da reddito sul territorio Europeo. È stata pertanto valutata la correttezza del tempo di sospensione di 3 giorni assegnato durante la fase di registrazione in Italia.

## **2.2 Scelta e validazione dei metodi analitici per la determinazione e quantificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacin negli studi di cinetica e di deplezione dei residui**

Per poter effettuare gli studi di cinetica e la verifica del tempo di sospensione è stato necessario allestire un metodo analitico in grado di quantificare Enrofloxacin e Ciprofloxacin nelle matrici di interesse.

Basandosi sui dati presenti in letteratura e sugli strumenti a disposizione nel laboratorio, per la separazione e la quantificazione degli analiti, è stato scelto un metodo in cromatografia liquida ad alta prestazione per il quale è stato usato un HPLC accoppiato ad un rivelatore di tipo fluorimetrico.

Sono state effettuate diverse prove, sia per ottimizzare le condizioni analitiche che per massimizzare i recuperi durante le fasi di estrazione, e sono stati scelti i protocolli che meglio si adattavano agli scopi del lavoro. La validazione è stata eseguita come previsto dalla normativa europea (Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE)

### **2.2.1. Materiali e metodi**

#### ***Composti chimici e reagenti***

Enrofloxacin (grado di purezza >99%), Ciprofloxacin (grado di purezza >99%), acido ortofosforico (grado di purezza 85%), acido trifluoroacetico (grado di purezza >99%) e sodio idrossido (in granuli) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Metanolo e acetonitrile (*HPLC grade*) sono stati acquistati da Carlo Erba-Reagenti (Milano, Italia). L'acqua deionizzata è stata prodotta con MilliQ Synthesis water purification system (Elix, MILLIPORE).

#### ***Materiali***

Materiale utilizzato: provette in plastica da 15 mL (Falcon), pipette pasteur monouso (Vetrotecnica, Padova, Italia). Colonna Synergi 4 $\mu$  Fusion – RP 80Å 150X4, 60mm; cartucce SPE Strata-X 33 $\mu$  Polymeric Reversed Phase; Vials 2,0 mL inserti 5mm 200  $\mu$ L flat (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Colonna

Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6x50mm 1,8 Micron (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### ***Strumentazione***

Sono stati usati i seguenti strumenti: una centrifuga PK131R ALC International S.r.l (Milano, Italy) e una Sorvall Super T21 Du Pont (Wilmington, DE, USA) entrambe usate durante la fase di estrazione del campione. I campioni sono stati portati a secco con un sistema in corrente d'azoto Turbo Vap LV Zymark, Caliper Life Sciences, (Hopkinton, Massachusetts, USA). Vortex Zx<sup>3</sup> (VELP Scientifica). Bagno a ultrasuoni CP102 Clia S.p.A. (Viciomaggio AR, Italia). Agitatore Yellow Line OS 5 Basic della ENCO s.r.l. Apparecchi Scientifici (Spinea VE, Italia).

Per quantificare Enrofloxacin e Ciprofloxacin è stato utilizzato un sistema HPLC (JASCO) composto da una pompa (PU-980), un degassatore (DG1580-53), un autocampionatore (AS-1555), un detector fluorimetrico (FP-920) dotato di software per cromatografia Borwin (version 1.5, JMBS Developments).

### ***Soluzioni madre e soluzioni di lavoro***

Sono state preparate per ogni analita soluzioni madre alla concentrazione di 1000 µg/mL sciogliendo in metanolo una appropriata quantità di standard analitico in polvere. Tali soluzioni sono state conservate a 4°C.

Le soluzioni di lavoro sono state preparate diluendo appropriate quantità di soluzione madre di ogni analita con una fase mobile composta da 20% Acetonitrile e 80% acido ortofosforico 0,025 M pH 3 in modo da ottenere dei mix alle concentrazioni di: 100, 250, 1000, 2000, 4000 e 8000 ng/mL.

### ***Standard di calibrazione***

Sono stati preparati standard di calibrazione a concentrazione nota nelle diverse matrici aggiungendo campioni bianchi di matrice tissutale o siero con un'appropriata quantità di soluzione di lavoro. La quantità di soluzione aggiunta alla matrice non superava mai il 10% del peso totale del campione. Sono stati preparati standard di calibrazione a 7 diversi livelli (10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng/mL) per il siero; a tre livelli per il muscolo e la quota mista cute e grasso (50, 100, 150 ng/mL); per il fegato (100, 200, 300 ng/mL); e per il rene (150, 300, 450 ng/mL). Gli standard di calibrazione del plasma

sono stati conservati a -80°C e analizzati dopo 30 giorni per valutarne la stabilità durante la conservazione dei campioni.

### **Metodi di estrazione**

Il siero è stato estratto secondo il protocollo modificato da Samanidou *et al.* (2005a). A 200 µL di siero sono stati aggiunti 3 mL di acetonitrile, sono stati agitati per 10 minuti, centrifugati a 4000 rpm (6350 g con centrifuga ALC) per 10 minuti e portati a secco a 50° in corrente di azoto. Il residuo secco è stato risospeso con 200 µL di fase mobile.

Il muscolo è stato estratto secondo il protocollo modificato da Samanidou *et al.* (2005b). A 1g di tessuto omogenato sono stati aggiunti 4 ml acido trifluoracetico in metanolo allo 0,1%. Dopo agitazione i campioni sono stati lasciati 10 minuti al buio, sono stati sonicati per 15 min e sono stati centrifugati a 4000 rpm per (6350 g con centrifuga ALC) 15 min. Il surnatante è stato prelevato ed è stata ripetuta la procedura. I surnatanti sono stati riuniti e portati a secco a 50° in corrente di azoto. I campioni sono stati risospesi in 2 mL di acido trifluoracetico 0,1% in acqua. È stata effettuata una purificazione in fase solida con cartucce SPE. Le cartucce sono state attivate con 2 mL di metanolo e condizionate con 2 mL di acqua, il campione è stato caricato e l'eluizione è stata fatta con 1,5 mL di acido trifluoracetico 0,1% in acetonitrile e 0,5 mL di acetonitrile. L'eluato è stato portato a secco a 50° in corrente di azoto. Il campione è stato risospeso 1 mL di fase mobile.

Cute e grasso sono stati estratti secondo protocollo modificato da Samanidou *et al.* (2005b). A 1g di tessuto omogenato sono stati aggiunti 4 ml acido trifluoracetico in metanolo allo 0,1%. Dopo agitazione i campioni sono stati lasciati 10 minuti al buio, sono stati sonicati per 15 min e sono stati centrifugati a 4000 rpm (6350 g con centrifuga ALC) per 15 min. Il surnatante è stato prelevato ed è stata ripetuta la procedura. I surnatanti sono stati riuniti e portati a secco a 50° in corrente di azoto. I campioni sono stati risospesi in 2 mL di acido trifluoracetico 0,1% in acqua. È stata effettuata una purificazione mediante estrazione in fase solida con cartucce SPE. Le cartucce sono state attivate con 2 mL di metanolo e condizionate con 2 mL di acqua, è stato caricato il campione, ed a seguire è stato effettuato un lavaggio con 3 mL di n-esano, si è eluito con 1,5 mL di acido trifluoracetico 0,1% in

acetonitrile e 0,5 mL di acetonitrile. L'eluato è stato portato a secco a 50° in corrente di azoto. Il campione è stato risospeso 1 mL di fase mobile.

Fegato e rene sono stati estratti secondo protocollo modificato da Samanidou *et al.* (2005b). A 1g di tessuto omogenato sono stati aggiunti 4 ml acido trifluoracetico in metanolo allo 0,1%. Dopo agitazione i campioni sono stati lasciati 10 minuti al buio, sono stati sonicati per 15 min e sono stati centrifugati a 8500 rpm per 15 minuti (8635 g con centrifuga Sorvall). Il surnatante è stato prelevato ed è stata ripetuta la procedura. I surnatanti sono stati riuniti e portati a secco a 50° in corrente di azoto. I campioni sono stati risospesi in 2 mL di acido trifluoracetico 0,1% in acqua. È stata effettuata una purificazione mediante estrazione in fase solida con cartucce SPE. Le cartucce sono state attivate con 2 mL di metanolo e condizionate con 2 mL di acqua, è stato caricato il campione, e a seguire è stato effettuato un lavaggio con 4 mL di n-esano e 4 mL di acqua e si è eluito con 1,5 mL di acido trifluoracetico 0,1% in acetonitrile e 0,5 mL di acetonitrile. L'eluato è stato portato a secco a 50° in corrente di azoto. Il campione è stato risospeso 1 mL di fase mobile.

### **Metodo cromatografico**

Il metodo cromatografico è stato ripreso e modificato dalla pubblicazione di Ramos *et al.* (2003).

Siero, muscolo e cute più grasso. La separazione cromatografica è stata effettuata mediante colonna Synergi fusion 150x4,6 mm (4µm) Phenomenex mantenuta a una temperatura di 23 ± 2°C, il volume di iniezione era di 10 µL. La fase mobile era composta da acido ortofosforico 0,025 M portato a pH 3 con soluzioni di sodio idrossido 5M e 0,1M (soluzione A), acetonitrile (soluzione B), metanolo (soluzione C) secondo il gradiente illustrato nelle tabelle 2.1 e 2.2. Il flusso era di 1 mL/min.

**Tabella 2.1** Gradiente utilizzato per l'analisi del siero.

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	A* %	B* %
0	1	84	16
8	1	84	16
11	1	20	80
14	1	20	80
16	1	84	16

\*A: acido ortofosforico 0,025 M pH 3, \*B: acetonitrile.

**Tabella 2.2** Gradiente utilizzato per l'analisi di muscolo e cute più grasso.

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	A* %	B* %	C* %
0	1	80	10	10
8	1	80	10	10
11	1	10	10	80
14	1	10	10	80
16	1	80	10	10

\*A: acido ortofosforico 0,025 M pH 3, \*B: acetonitrile, \*C metanolo

L'identificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacin è stata effettuata mediante fluorimetro con  $\lambda$  di eccitazione di 278 nm e  $\lambda$  di emissione 450 nm. L'attenuazione è stata impostata a 128 e il gain a 1.

Fegato e rene. La separazione cromatografica è stata effettuata mediante colonna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 4,6x50mm 1,8  $\mu$  mantenuta a una temperatura di 23  $\pm$  2°C. Il volume di iniezione era di 10  $\mu$ L. La fase mobile era composta da acido ortofosforico 0,025 M portato a pH 3 con soluzioni di sodio idrossido 5M e 0,1M (soluzione A), acetonitrile (soluzione B), metanolo (soluzione C) in percentuale variabile secondo il gradiente illustrato nella tabella 2.3. Il flusso era di 0,5 mL/min.

**Tabella 2.3** Gradiente utilizzato per l'analisi di fegato e rene.

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	A* %	B* %	C* %
0	0,5	82	12	6
8	0,5	82	12	6
11	0,5	8	12	80
14	0,5	8	12	80
16	0,5	82	12	6

\*A: acido ortofosforico 0,025 M pH 3, \*B: acetonitrile, \*C: metanolo

L'identificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacin è stata effettuata mediante fluorimetro con  $\lambda$  di eccitazione di 278 nm e  $\lambda$  di emissione 450 nm. L'attenuazione è stata impostata a 128 e il gain a 1.

### **Validazione del metodo**

Il metodo analitico è stato validato in base alla normativa attualmente in vigore (Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE) e alle linee guida dell'EMA (2003).

La specificità è stata valutata usando 20 matrici bianche e 20 a cui erano state addizionate Enrofloxacin e Ciprofloxacina per verificare l'assenza di picchi interferenti al tempo di ritenzione degli analiti di interesse.

La linearità per il siero è stata valutata nel range 10-800 ng/mL utilizzando sette standard di calibrazione sia per la Ciprofloxacina che per l'Enrofloxacin. Per tutti gli altri tessuti sono stati usati come standard di calibrazione il limite massimo residuale (LMR), la sua metà e il LMR più la sua metà, come previsto dalla normativa per la validazione dei metodi analitici applicati agli studi di deplezione residuale (EMA, 2003).

La stabilità dell'Enrofloxacin e della Ciprofloxacina è stata valutata per la matrice siero conservando gli standard di calibrazione a -80°C per 30 giorni e poi analizzandoli. Le soluzioni madre e le soluzioni di lavoro sono state conservate a +4°C e analizzate, per valutarne la stabilità, a intervalli regolari di tempo previa opportuna diluizione.

Sono state valutate accuratezza e precisione in giorni diversi utilizzando gli standard di calibrazione. È stato analizzato uno standard di calibrazione per ogni concentrazione, tale procedura è stata ripetuta in 6 giorni diversi. La precisione è stata valutata come coefficiente di variazione (CV). L'accuratezza è stata espressa in percentuale ed è stata calcolata come rapporto tra il valore calcolato (valore misurato\*recupero) e il valore predetto per cento, come previsto dalla legislazione vigente (Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE).

Siero. Il limite di identificazione (LOD) è stato calcolato come media analitica del rumore di fondo di 20 bianchi più 3 volte la sua deviazione standard (DS). Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato come media analitica del rumore di fondo di 20 bianchi più 10 DS.

Matrici tissutali. Dovendo analizzare i campioni di tessuto solo allo scopo di valutare il tempo di sospensione, il LOD e il LOQ non sono stati valutati come matrice considerata, come previsto dalla *guideline* EMA di riferimento (2003). Il recupero è stato calcolato come rapporto in percentuale tra l'area del picco ottenuto iniettando soluzioni a concentrazione nota di Enrofloxacin e Ciprofloxacina in fase mobile e le soluzioni degli standard di calibrazione alla medesima concentrazione.

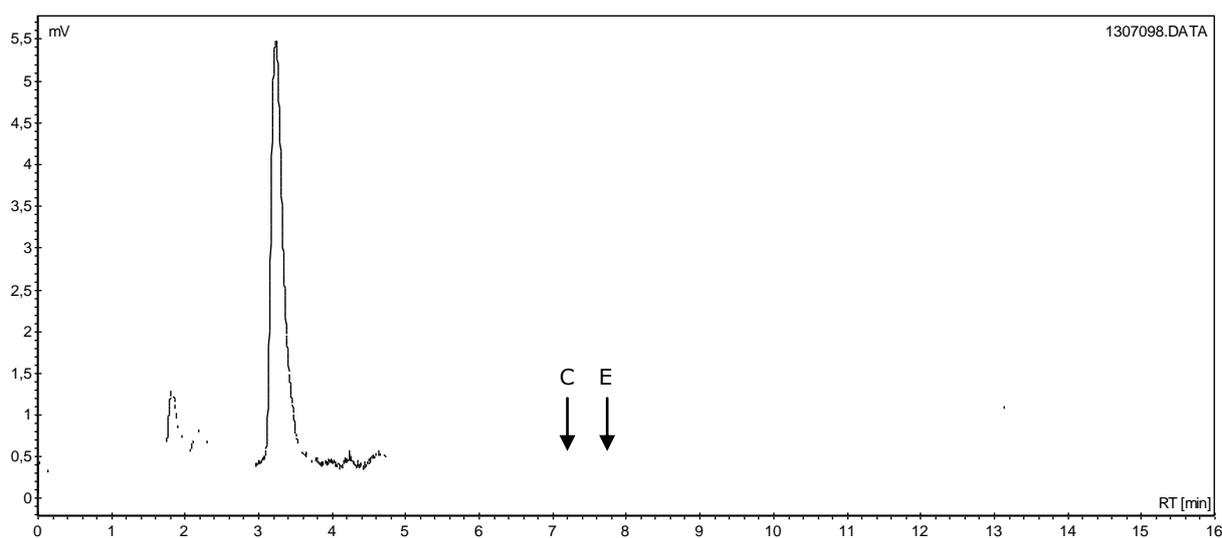
## 2.2.2. Risultati

La durata della corsa è di 16 minuti per tutte le matrici. I tempi di ritenzione della Ciprofloxacina e dell'Enrofloxacina sono rispettivamente 7,3 min e 7,7 min per il siero, 7,2 min e 7,6 min per muscolo e cute più grasso e 3,9 min e 5,3 min per rene e fegato.

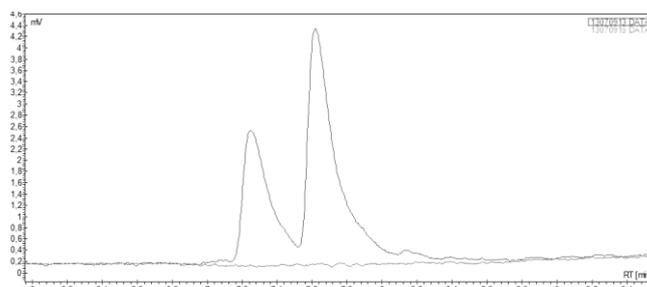
### **Specificità**

La specificità del metodo è stata confermata per tutte le matrici dall'assenza di interferenti con lo stesso tempo di ritenzione dei composti di interesse come illustrato nelle figure da 2.1 a 2.10.

**Figura 2.1** Cromatogramma di un campione bianco di siero. Le frecce indicano i tempi di ritenzione di Ciprofloxacina e Enrofloxacina.

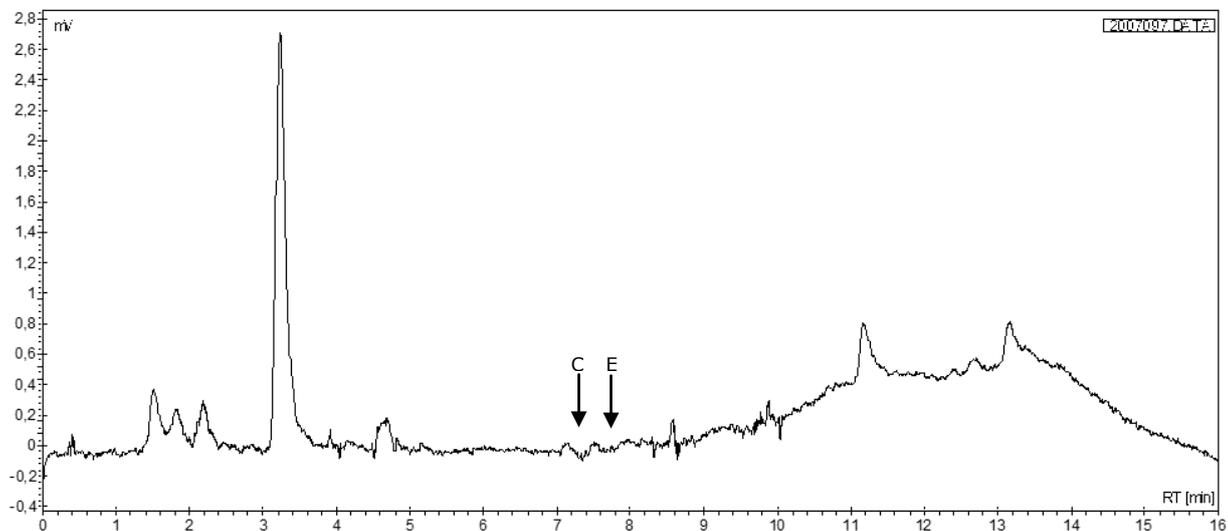


**Figura 2.2** Sovrapposizione dei cromatogrammi di un campione bianco di siero (in grigio) di uno standard di calibrazione di siero (bianco addizionato) da 50 ng/mL (in nero)\*.

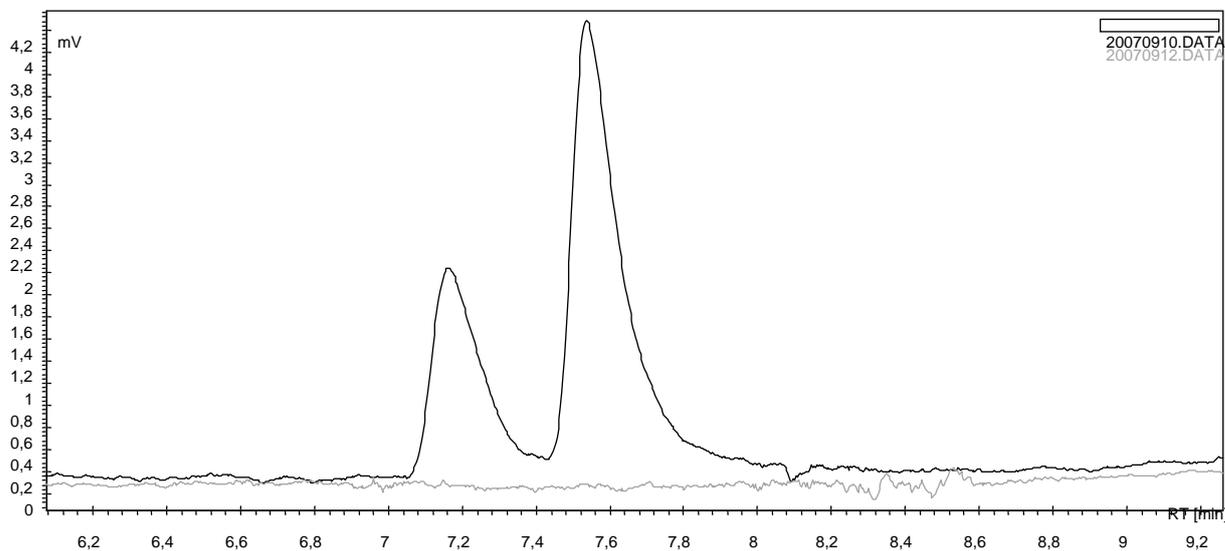


\*Ingrandimento del tratto di corsa cromatografica in cui si presentano i picchi di Ciprofloxacina e Enrofloxacina.

**Figura 2.3** Cromatogramma di un campione bianco di muscolo. Le frecce indicano i tempi di ritenzione di Ciprofloxacina e Enrofloxacin.

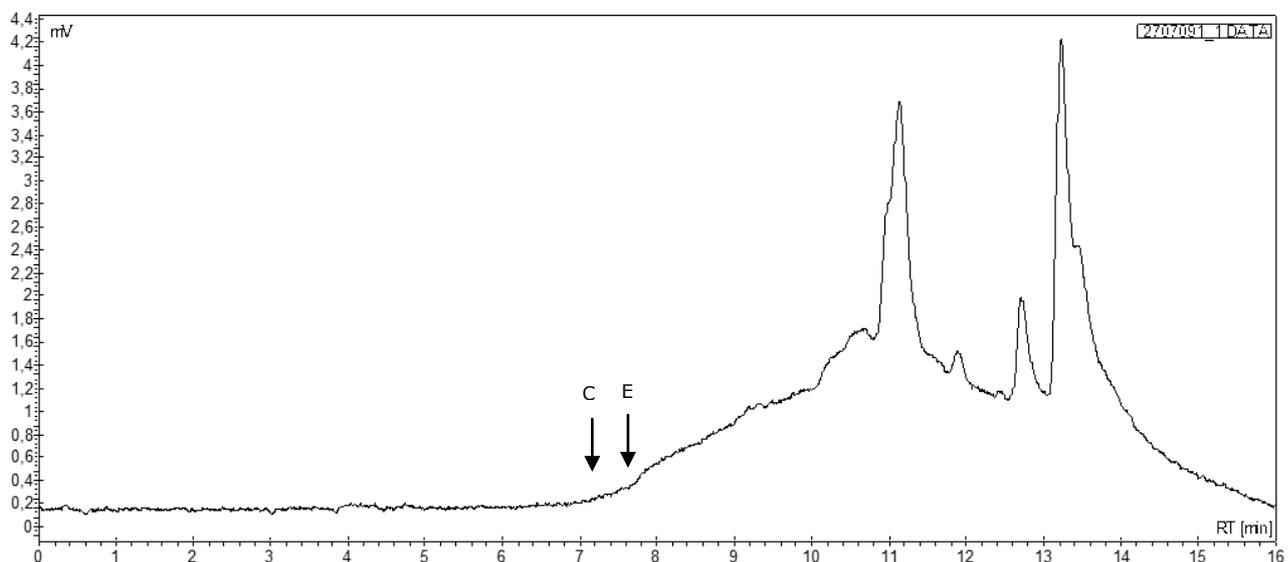


**Figura 2.4** Sovrapposizione dei cromatogrammi di un campione bianco di muscolo (in grigio) di uno standard di calibrazione di muscolo (bianco addizionato) da 50 ng/mL (in nero)\*.

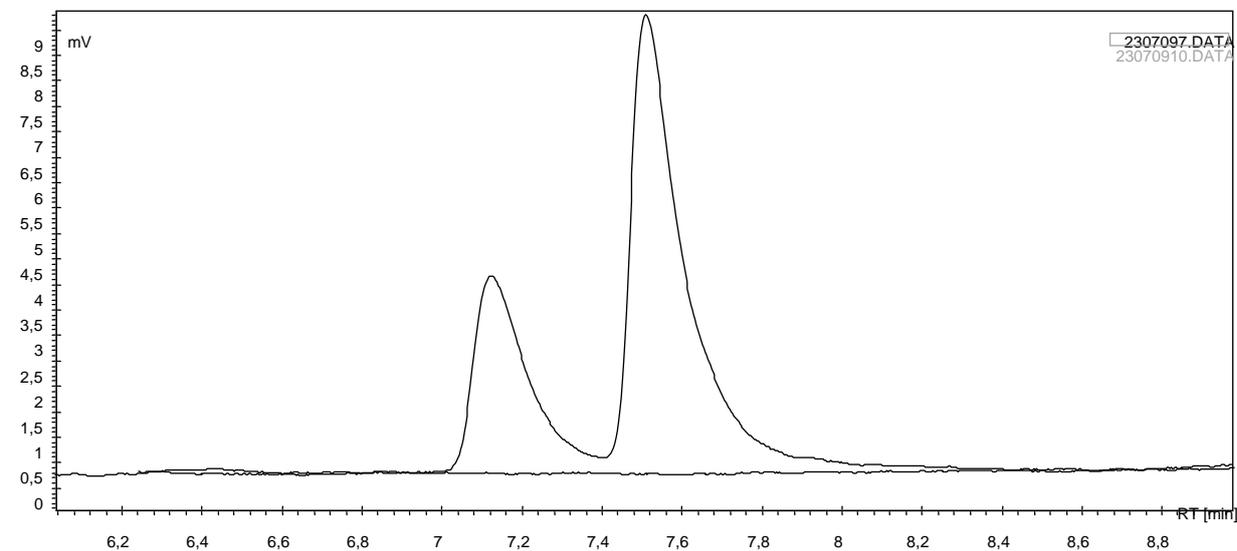


\*Ingrandimento del tratto di corsa cromatografica in cui si presentano i picchi di Ciprofloxacina e Enrofloxacin

**Figura 2.5** Cromatogramma di un campione bianco di cute più grasso. Le frecce indicano i tempi di ritenzione di Ciprofloxacina e Enrofloxacin.

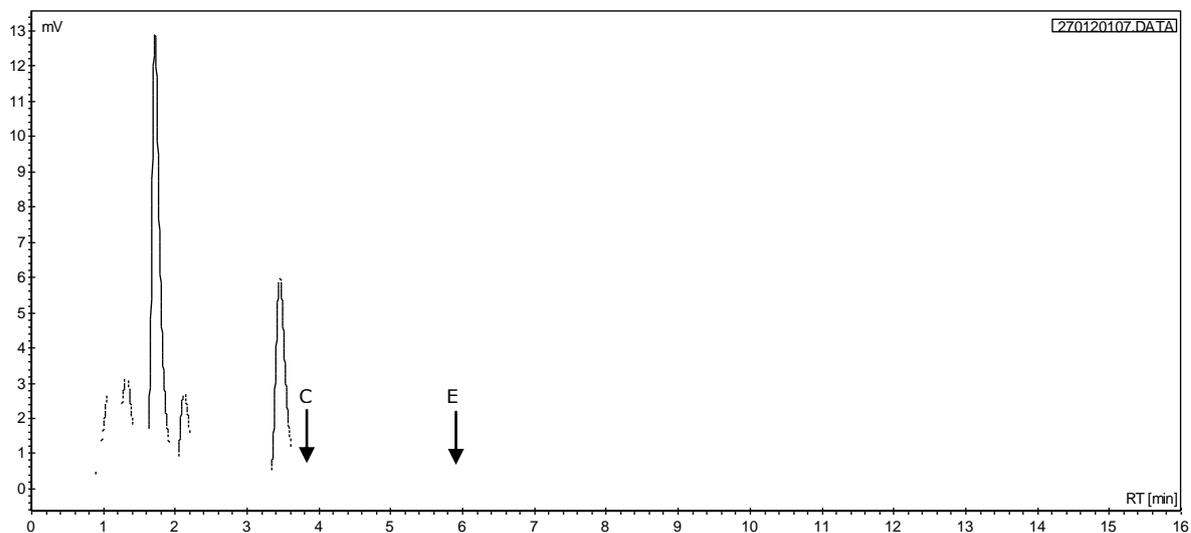


**Figura 2.6** Sovrapposizione dei cromatogrammi di un campione bianco di cute più grasso (in grigio) di uno standard di calibrazione (bianco addizionato) da 100 ng/mL (in nero)\*.

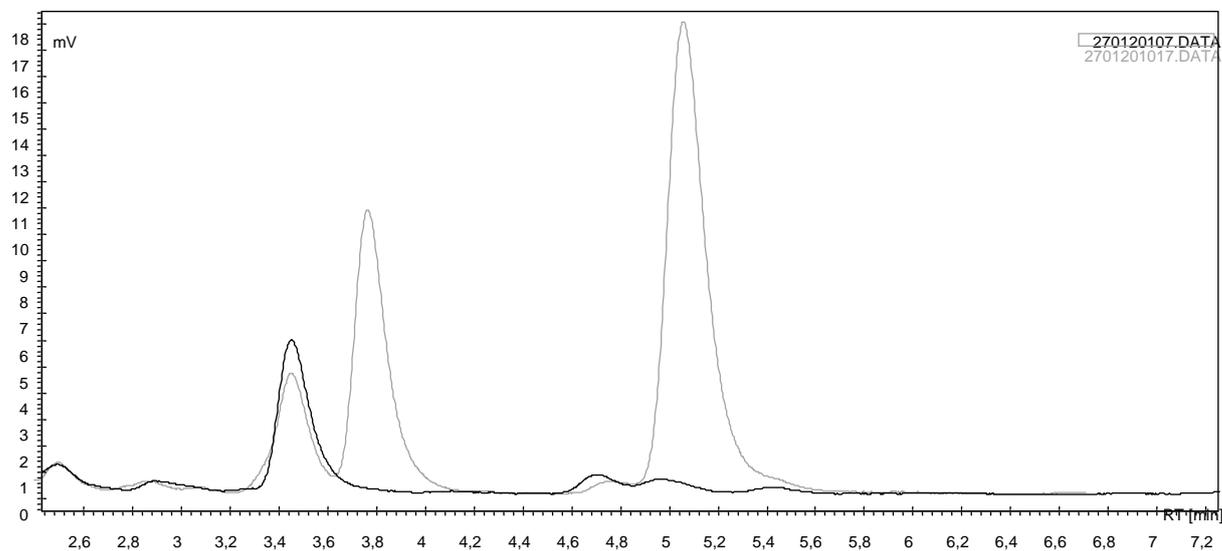


\*Ingrandimento del tratto di corsa cromatografica in cui si presentano i picchi di Ciprofloxacina e Enrofloxacin.

**Figura 2.7** Cromatogramma di un campione bianco di rene. Le frecce indicano i tempi di ritenzione di Ciprofloxacina e Enrofloxacina.

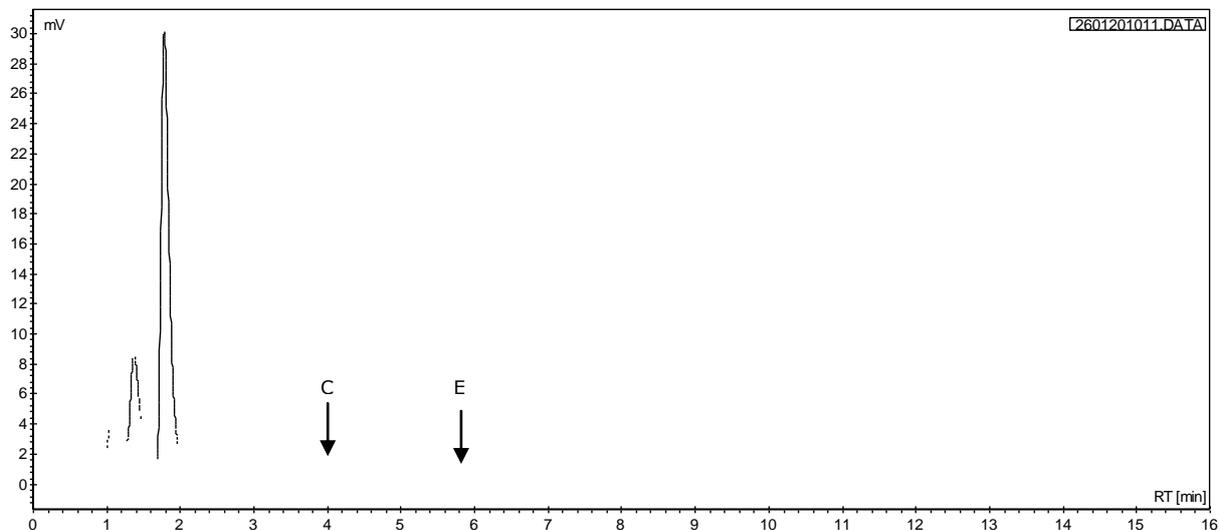


**Figura 2.8** Sovrapposizione dei cromatogrammi di un campione bianco di rene (in nero) di uno standard di calibrazione di rene (bianco addizionato) da 10 ng/mL (in rosso)\*.

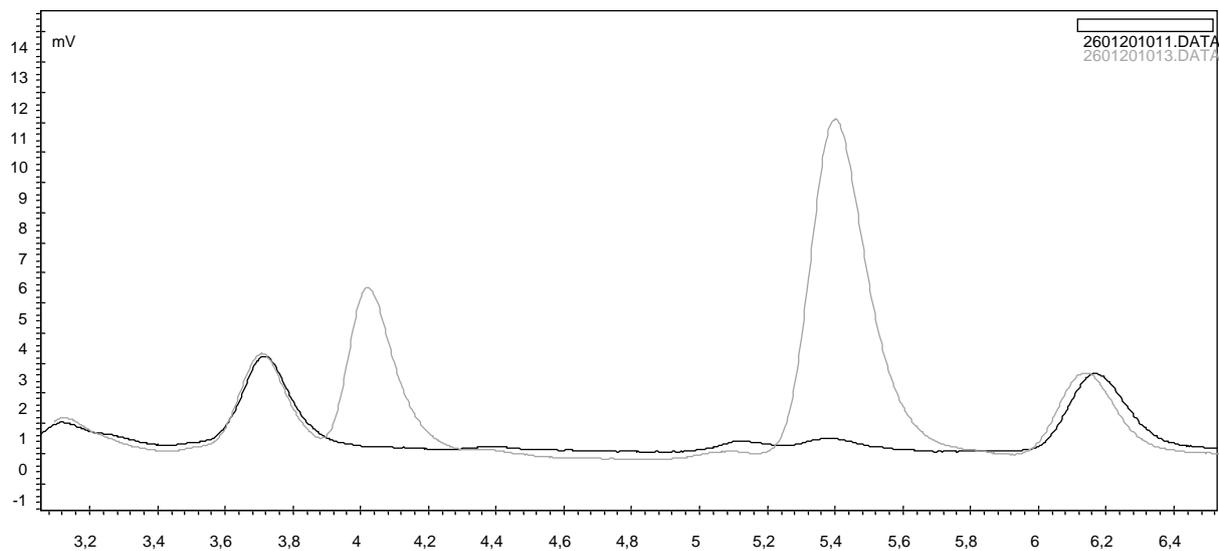


\*Ingrandimento del tratto di corsa cromatografica in cui si presentano i picchi di Ciprofloxacina e Enrofloxacina

**Figura 2.9** Cromatogramma di un campione bianco di fegato. Le frecce indicano i tempi di ritenzione di Ciprofloxacina e Enrofloxacina.



**Figura 2.10** Sovrapposizione dei cromatogrammi di un campione bianco di fegato (in nero) di uno standard di calibrazione di fegato (bianco addizionato) da 10 ng/mL (in grigio).

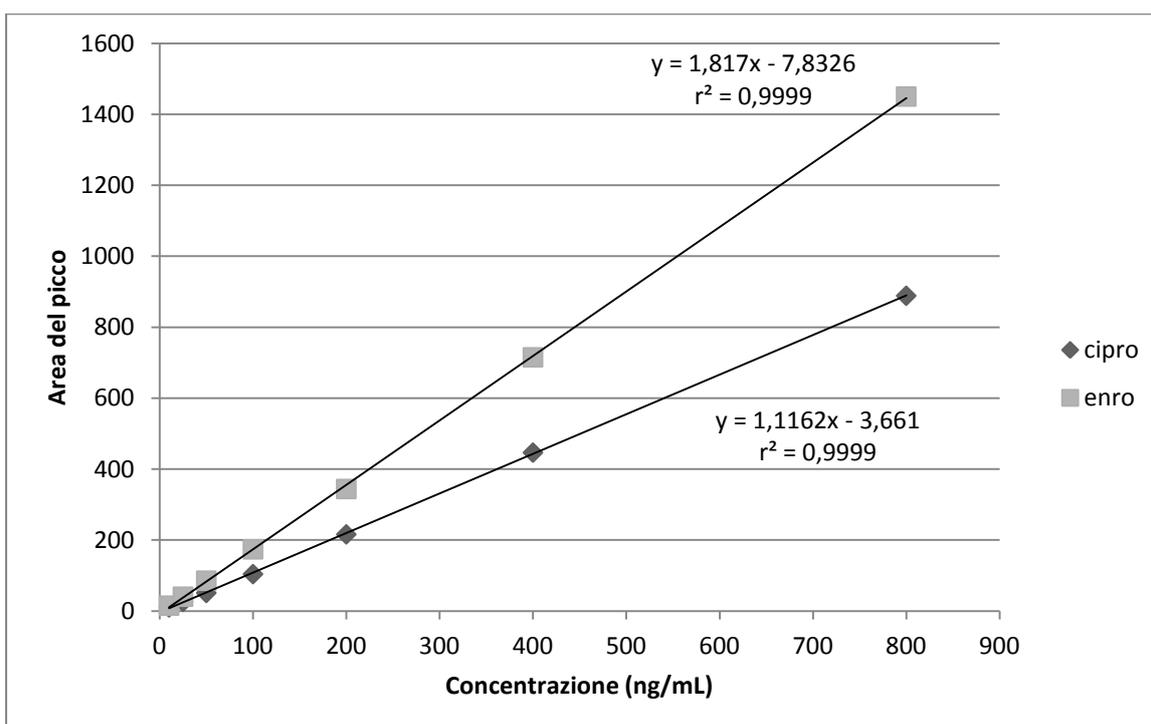


\*Ingrandimento del tratto di corsa cromatografica in cui si presentato i picchi di Ciprofloxacina e Enrofloxacina.

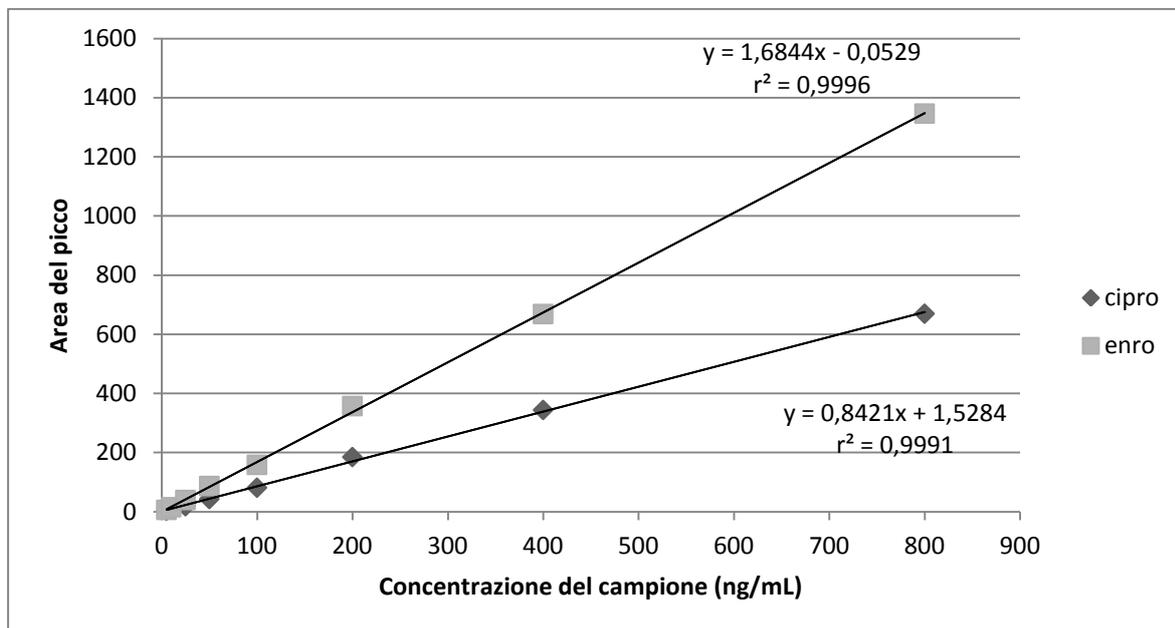
## Linearità

La linearità è stata valutata sia per le soluzioni di standard analitico in fase mobile che per gli standard di calibrazione ottenuti aggiungendo campioni bianchi. In figura 2.11 è illustrata la retta degli standard di Ciprofloxacina e Enrofloxacin con le relative equazioni di regressione e coefficiente di correlazione ( $r^2$ ). Nelle figure da 2.12 a 2.16 sono illustrate le rette degli standard di calibrazione di Ciprofloxacina e Enrofloxacin, ottenute con le diverse matrici prese in esame, con le relative equazioni di regressione e coefficiente di correlazione ( $r^2$ ).

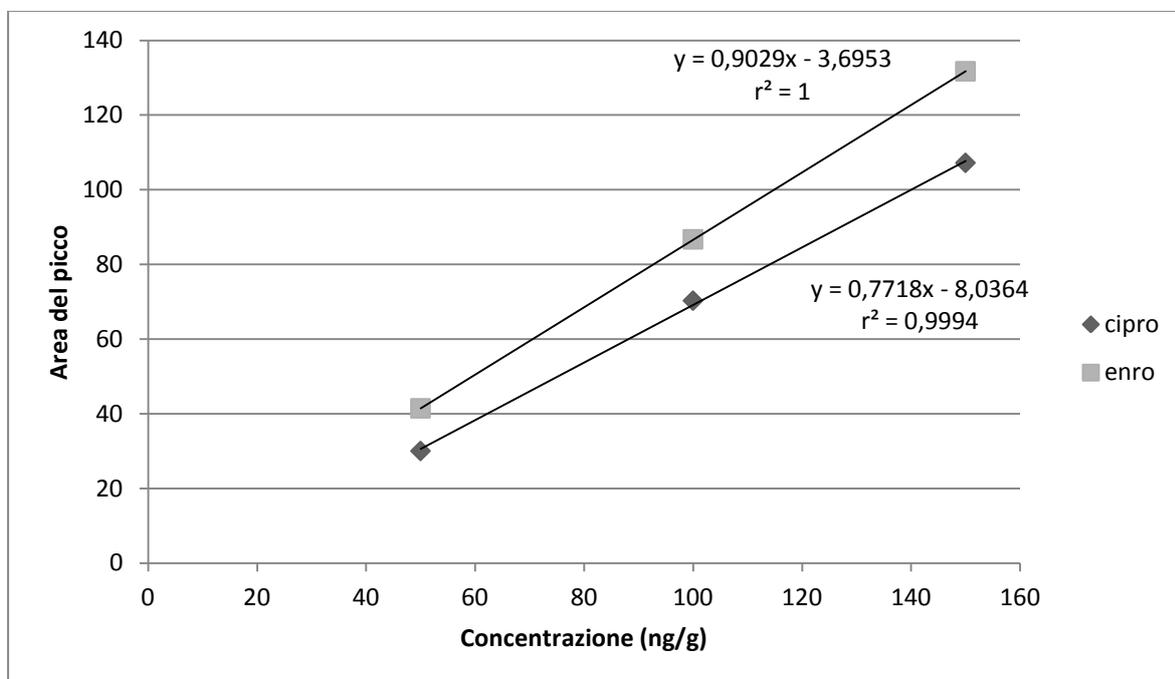
**Figura 2.11** Retta degli standard di Enrofloxacin e Ciprofloxacina in fase mobile.



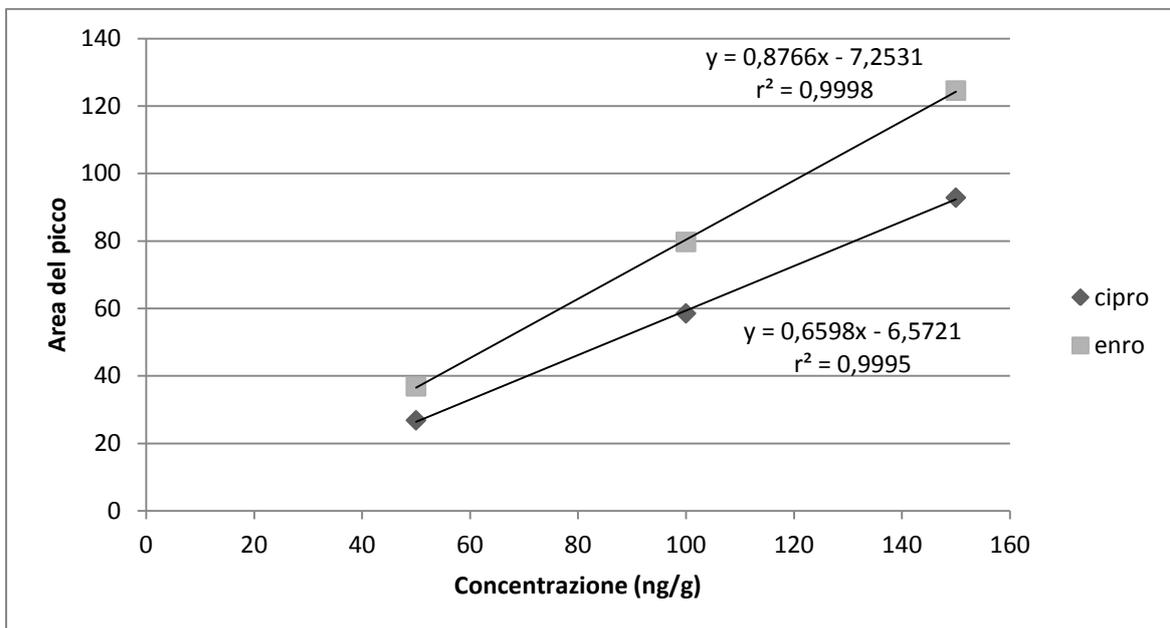
**Figura 2.12** Retta degli standard di calibrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina per la matrice siero.



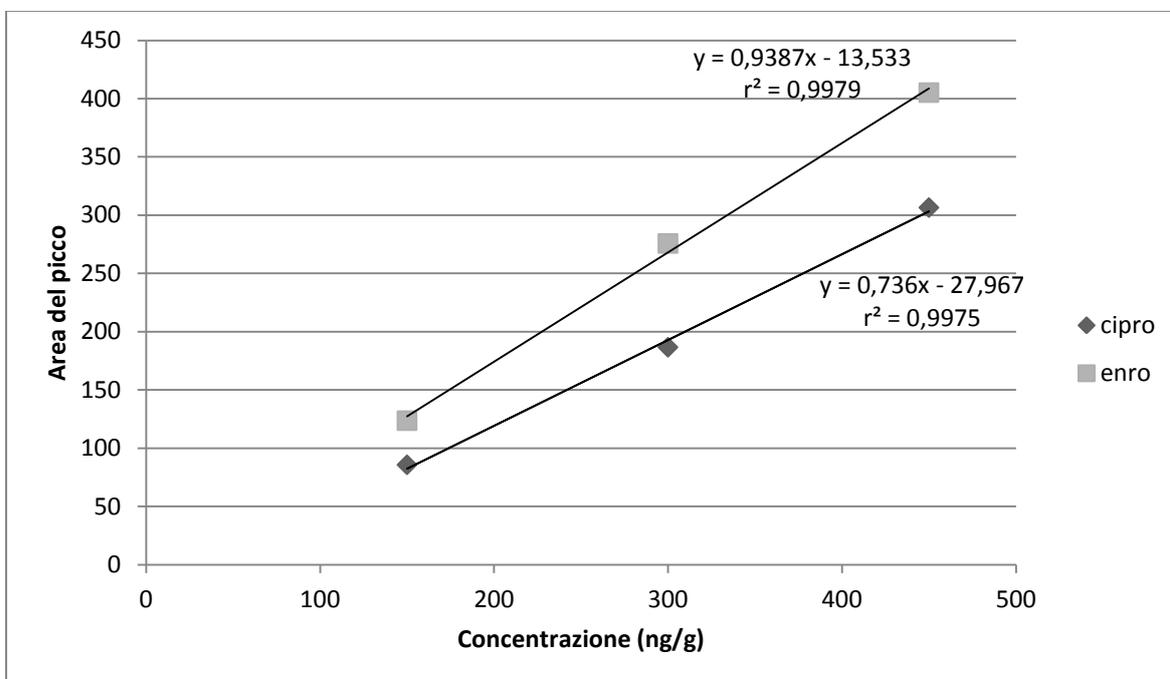
**Figura 2.13** Retta degli standard di calibrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina per la matrice muscolo.



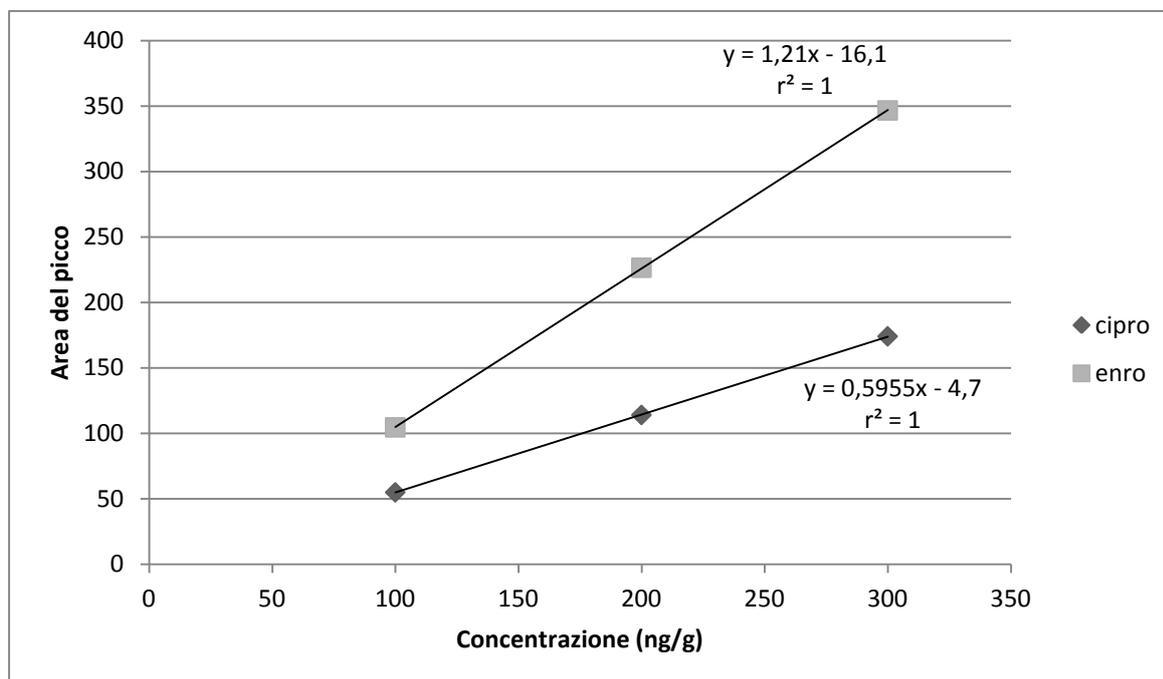
**Figura 2.14** Retta degli standard di calibrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina per la matrice cute e grasso.



**Figura 2.15** Retta degli standard di calibrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina per la matrice rene.



**Figura 2.16** Retta degli standard di calibrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacin per la matrice fegato.



### **Stabilità**

Le soluzioni madre si sono dimostrate stabili per almeno 12 mesi e le soluzioni di lavoro per almeno 6 mesi. Gli standard di calibrazione del siero si sono dimostrati stabili a  $-80^{\circ}\text{C}$  per almeno 30 giorni.

### **Accuratezza, precisione e recupero**

Il recupero medio percentuale (RMP), la sua deviazione standard, la precisione, espressa come coefficiente di variazione (CV) e l'accuratezza espressa in percentuale per le diverse matrici sono riportate nelle tabelle da 2.4 a 2.8.

**Tabella 2.4** Recupero medio percentuale (RMP)  $\pm$  la sua deviazione standard (DS), precisione (CV) e accuratezza percentuale (A%) per la matrice siero.

concentrazione	Ciprofloxacina			Enrofloxacin		
	RMP $\pm$ DS	CV	A%	RMP $\pm$ DS	CV	A%
5 ng/mL	-	-	-	48,68 $\pm$ 12,94	26,57	99,34
10 ng/mL	36,82 $\pm$ 3,25	8,83	99,53	73,22 $\pm$ 1,76	2,40	100,30
25 ng/mL	57,92 $\pm$ 1,25	2,16	99,87	84,65 $\pm$ 2,76	3,26	99,59
50 ng/mL	70,92 $\pm$ 2,96	4,17	99,89	91,17 $\pm$ 4,35	4,77	100,18
100 ng/mL	69,67 $\pm$ 5,14	7,38	99,53	86,41 $\pm$ 4,10	4,75	99,33
200 ng/mL	77,68 $\pm$ 5,79	7,45	99,59	92,19 $\pm$ 5,92	6,43	99,68
400 ng/mL	79,65 $\pm$ 4,75	5,96	99,56	93,81 $\pm$ 5,40	5,76	99,79
800 ng/mL	78,77 $\pm$ 3,23	4,10	99,71	94,94 $\pm$ 2,84	2,99	99,94

**Tabella 2.5** Recupero medio percentuale (RMP)  $\pm$  la sua deviazione standard (DS), precisione (CV) e accuratezza percentuale (A%) per la matrice muscolo.

concentrazione	Ciprofloxacina			Enrofloxacin		
	RMP $\pm$ DS	CV	A%	RMP $\pm$ DS	CV	A%
50 ng/g	63,27 $\pm$ 9,49	15,00	100,44	82,90 $\pm$ 13,43	16,20	99,89
100 ng/g	67 $\pm$ 2,44	3,64	100	83,25 $\pm$ 5,03	6,04	100,30
150 ng/g	69,83 $\pm$ 3,06	4,38	102,69	87,21 $\pm$ 2,46	2,82	100,24

**Tabella 2.6** Recupero medio percentuale (RMP)  $\pm$  la sua deviazione standard (DS), precisione (CV) e accuratezza percentuale (A%) per la matrice cute più grasso.

concentrazione	Ciprofloxacina			Enrofloxacin		
	RMP $\pm$ DS	CV	A%	RMP $\pm$ DS	CV	A%
100 ng/g	52,11 $\pm$ 3,04	5,83	100,22	64,81 $\pm$ 9,66	14,90	99,70
200 ng/g	53,84 $\pm$ 6,71	12,45	97,70	68,20 $\pm$ 4,98	7,30	100,30
300 ng/g	56,54 $\pm$ 6,49	11,48	104,94	68,07 $\pm$ 9,06	13,31	104,49

**Tabella 2.7** Recupero medio percentuale (RMP)  $\pm$  la sua deviazione standard (DS), precisione (CV) e accuratezza percentuale (A%) per la matrice rene.

concentrazione	Ciprofloxacina			Enrofloxacin		
	RMP $\pm$ DS	CV	A%	RMP $\pm$ DS	CV	A%
150 ng/g	61,98 $\pm$ 5,65	9,11	99,97	45,77 $\pm$ 3,72	8,12	99,49
300 ng/g	61,90 $\pm$ 5,90	9,53	99,83	64,82 $\pm$ 8,78	13,55	99,72
450 ng/g	71,18 $\pm$ 5,50	7,73	100,26	56,14 $\pm$ 5,93	10,56	100,26

**Tabella 2.8** Recupero medio percentuale (RMP)  $\pm$  la sua deviazione standard (DS), precisione (CV) e accuratezza percentuale (A%) per la matrice fegato.

concentrazione	Ciprofloxacina			Enrofloxacin		
	RMP $\pm$ DS	CV	A%	RMP $\pm$ DS	CV	A%
50 ng/g	63,98 $\pm$ 9,21	14,40	99,97	76,85 $\pm$ 8,08	10,51	99,81
100 ng/g	68,54 $\pm$ 8,20	11,98	100,67	83,95 $\pm$ 3,90	10,56	100,68
150 ng/g	68,46 $\pm$ 7,23	4,65	99,94	83,47 $\pm$ 5,92	7,09	100,56

### **LOD e LOQ**

Siero. Il LOD e il LOQ per la Ciprofloxacina sono rispettivamente 5 e 10 ng/mL. Il LOD e il LOQ per l'Enrofloxacin sono rispettivamente 3 e 5 ng /mL.

### **2.2.3. Discussione**

Partendo dai dati presenti in letteratura sono stati allestiti dei metodi analitici che permettessero di effettuare uno studio di farmacocinetica e uno di deplezione residuale nel tacchino da carne. In particolare per l'estrazione da siero negli studi di cinetica è stato necessario allestire un metodo che fosse affidabile anche partendo da una scarsa quantità di materiale, infatti le dimensioni dei tacchini e la necessità di fare prelievi ripetuti sempre dallo stesso soggetto rendevano impossibile il prelievo di grandi quantità di sangue. Le metodiche presenti in letteratura sono state sensibilmente modificate per essere adattate alle matrici fegato e rene, in particolare è stata impiegata una colonna diversa che permettesse di separare alcuni interferenti con lo stesso tempo di ritenzione dei composti di interesse.

Tutti i metodi di estrazione descritti sono stati validati secondo la normativa vigente e si sono dimostrati idonei per le analisi da effettuare.

## **2.3. Efficacia della posologia autorizzata dell'Enrofloxacin con somministrazione mediante acqua di bevanda**

Lo scopo di questo lavoro è stato studiare la cinetica ematica dell'Enrofloxacin durante la somministrazione pulsata in acqua di abbeverata del farmaco ai dosaggi autorizzati per 5 giorni.

Lo studio è stato suddiviso in tre fasi. La prima è stata una prova preliminare condotta su animali sani in cui è stata valutata la posologia autorizzata

diluendo il farmaco come consigliato dal foglietto illustrativo. Nella seconda fase è stata studiata la cinetica sia su animali sani che su animali affetti da colibacillosi, ai quali è stato somministrato il principio attivo ad una concentrazione adeguata a raggiungere la dose 10 mg/kg. Nella terza fase, condotta parallelamente alle altre, è stata valutata la sensibilità mediante determinazione della MIC dell'Enrofloxacin in 89 ceppi di APEC isolati in campo tra il 2009 e il 2010.

Infine i dati cinetici sono stati confrontati, mediante un modello PK/PD, con le MIC dei ceppi batterici isolati per valutare l'efficacia di questo tipo di trattamento nei confronti delle popolazioni di APEC attualmente circolanti.

Gli studi farmacocinetici in vivo sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Padova (numero del progetto 55/2009)

### **2.3.1. Materiali e metodi dello studio di farmacocinetica**

#### ***Studio di cinetica preliminare: tacchini sani***

Dieci tacchini maschi di 40 giorni, sani sulla base di un esame clinico, sono stati selezionati da un allevamento industriale di tacchini ibridi da carne, facente parte del gruppo Agricola Tre Valli (Verona, Italia). I tacchini sono stati stabulati in gruppo, in una voliera di 4 mq con accesso libero a acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini in accrescimento).

Dopo un periodo di acclimatamento di 8 giorni, ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile. I tacchini sono stati trattati con Enrofloxacin (Baytril 10% O. L., Bayer, Milano, Italy) per via orale in acqua di abbeverata come indicato nel foglietto illustrativo. La somministrazione di tipo pulsato è stata effettuata per 5 giorni, fornendo acqua medicata con una concentrazione di farmaco di 50 µg/mL (come suggerito nel foglietto illustrativo) dalle 8.00 alle 18.00. Dalle 18.00 alle 8.00 del giorno successivo ai tacchini veniva fornita acqua non medicata. Per valutare la quantità di farmaco assunto tutti i giorni veniva verificato il consumo di acqua dalle 8.00 alle 18.00.

Durante il primo e l'ultimo giorno di trattamento sono stati effettuati prelievi ematici per la valutazione farmacocinetica. I prelievi sono stati fatti alternativamente dalle vene alari e dalle vene tarsali prima dell'inizio del trattamento, ogni due ore durante il trattamento e 1, 2, 4, 8 e 12 ore dopo la

rimozione dell'acqua medicata. Il quinto giorno è stato effettuato anche un prelievo a 24h dalla fine del trattamento. Il siero è stato separato mediante centrifugazione e conservato a -80°C.

### ***Studio di cinetica 10 mg/kg: tacchini sani e malati***

**Tacchini sani.** Dieci tacchini maschi di 40 giorni, sani sulla base di un esame clinico, sono stati selezionati da un allevamento industriale di tacchini ibridi da carne, facente parte del gruppo Agricola Tre Valli (Verona, Italia). I tacchini sono stati stabulati in gruppo, in una voliera di 4 mq con accesso libero a acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini in accrescimento).

Dopo un periodo di acclimatamento di 16 giorni, ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile.

A partire da 3 giorni prima dell'inizio del trattamento è stata misurata giornalmente la quantità di acqua consumata dai tacchini tra le 8.00 e le 18.00. Gli animali sono stati trattati con Enrofloxacin (Baytril 10% O. L., Bayer, Milano, Italy) per via orale in acqua di abbeverata secondo uno schema di tipo pulsato somministrando acqua medicata dalle 8.00 alle 18.00 per 5 giorni. La concentrazione da utilizzare, in modo da raggiungere il dosaggio autorizzato di 10 mg/kg *die*, è stata calcolata sulla base della quantità di acqua consumata il giorno precedente e del peso dei tacchini.

Durante l'ultimo giorno di trattamento sono stati effettuati prelievi ematici per la valutazione farmacocinetica. I prelievi sono stati fatti alternativamente dalle vene alari e dalle vene tarsali prima dell'inizio del trattamento, ogni due ore durante il trattamento e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 ore dopo la rimozione dell'acqua medicata. Il siero è stato separato mediante centrifugazione e conservato a -80°C.

**Tacchini malati.** La stessa prova è stata ripetuta su 10 tacchini da carne maschi di 54 giorni provenienti da un allevamento intensivo da carne facente parte dell'Agricola Tre Valli (Verona, Italia) affetti da una forma grave di colibacillosi setticemica. La diagnosi effettuata mediante necropsia e analisi batteriologica di altri soggetti provenienti dallo stesso capannone e con la stessa sintomatologia è stata poi confermata tramite esame necroscopico al termine della prova di farmacocinetica.

Il trattamento è stato effettuato, come nel gruppo precedente, in acqua di abbeverata dalle 8.00 alle 18.00 misurando l'abbeverata dei tacchini e adeguando la concentrazione del farmaco in modo che assumessero 10 mg/kg/die. Il numero di prelievi ematici è stato ridotto per evitare di stressare troppo soggetti già fortemente debilitati. I prelievi sono stati effettuati prima dell'inizio del trattamento e al quinto giorno ogni 3 ore durante il trattamento e 2, 5, 12 e 24 ore dopo la fine del trattamento. Il siero è stato separato mediante centrifugazione e conservato a -80°C.

### ***Analisi dei campioni di siero***

Le analisi dei campioni di siero prelevati per la quantificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacin sono state effettuate come descritto al paragrafo 2.2.

### ***Analisi farmacocinetica e analisi statistica***

L'analisi farmacocinetica è stata fatta utilizzando un software commerciale dedicato (Phoenix WinNonLin 6.1, Pharsight Corporation). In particolare l'area sotto la curva da 0 a 24h ( $AUC_{0-24}$ ) è stata ottenuta utilizzando il metodo trapezoidale, mentre il picco di concentrazione ( $C_{max}$ ) e il tempo necessario per raggiungere il picco ( $T_{max}$ ) sono stati ricavati dall'osservazione dei dati sperimentali.

La normalità della distribuzione dei parametri ottenuti dallo studio farmacocinetico è stata verificata utilizzando il Kolmogorov-Smirnov test. Il confronto dei dati a coppie è stato effettuato utilizzando un T-test a due code. La significatività statistica è stata assegnata in presenza di un valore di  $P < 0,05$ . Queste analisi statistiche sono state fatte utilizzando GraphPad Prism (versione 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## **2.3.2. Risultati dello studio di farmacocinetica**

### ***Studio di cinetica preliminare : tacchini sani***

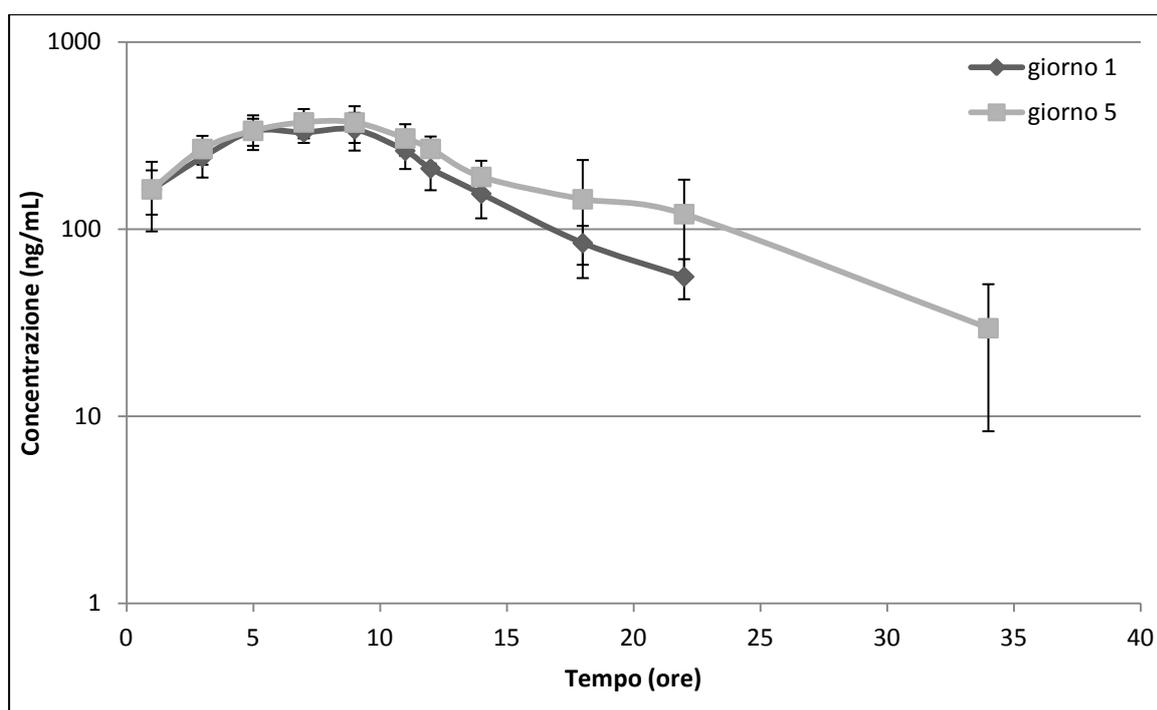
Il peso degli animali all'inizio della prova era compreso tra 3,6 e 4,7 kg. Valutando il peso dei tacchini e l'acqua assunta, usando una concentrazione di 50 µg/mL sono stati somministrati 4,3 mg/kg/die di Enrofloxacin.

Le curve di concentrazione tempo dipendenti dell'Enrofloxacin del primo e del quinto giorno di trattamento sono riportate in figura 2.17, mentre i parametri

farmacocinetici  $T_{max}$ ,  $C_{max}$  e AUC sono riportati in tabella 2.9. Dall'analisi statistica non sono emerse differenze significative tra i dati relativi al primo e quelli relativi al quinto giorno di trattamento.

Non sono stati riportati dati relativi alla Ciprofloxacina perché la quantità presente nel siero era in quasi tutti i campioni al di sotto del LOQ.

**Figura 2.17** Curve di concentrazione sierica media tempo dipendenti dell'Enrofloxacin al primo e quinto giorno di trattamento (4,3 mg/kg).

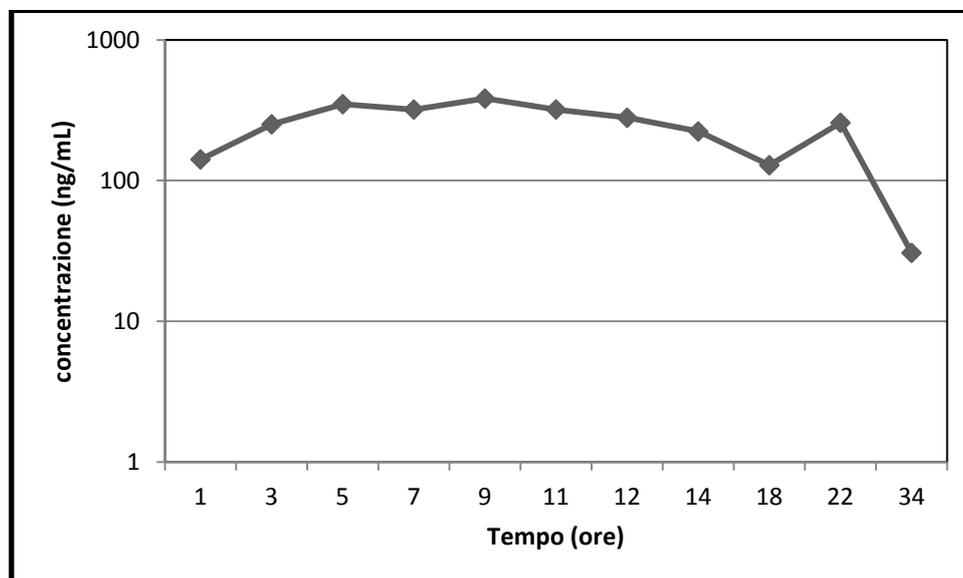


**Tabella 2.9** Parametri farmacocinetici dell'Enrofloxacin al primo e quinto giorno di trattamento (4,3 mg/kg).

	Giorno 1 (media $\pm$ DS)	Giorno 5 (media $\pm$ DS)
$C_{max}$ (ng/mL)	374,57 $\pm$ 67,04	395,94 $\pm$ 61,24
$T_{max}$ (h)	7,25 $\pm$ 1,67	7,44 $\pm$ 1,67
AUC <sub>0-24</sub> (h·ng/mL)	4334,04 $\pm$ 644,05	5530,78 $\pm$ 1288,58

Al quinto giorno di trattamento quattro tacchini presentano un picco secondario di Enrofloxacin dopo il termine delle 10 ore di trattamento. In figura 2.18 è riportata la curva concentrazione tempo dipendente dell'Enrofloxacin relativa al quinto giorno di trattamento di uno di questi soggetti.

**Figura 2.18** Curva di concentrazione sierica tempo dipendente dell'Enrofloxacin al quinto giorno di trattamento (4,3 mg/kg) di un tacchino che presenta un picco secondario dopo 12 ore dalla fine del trattamento.

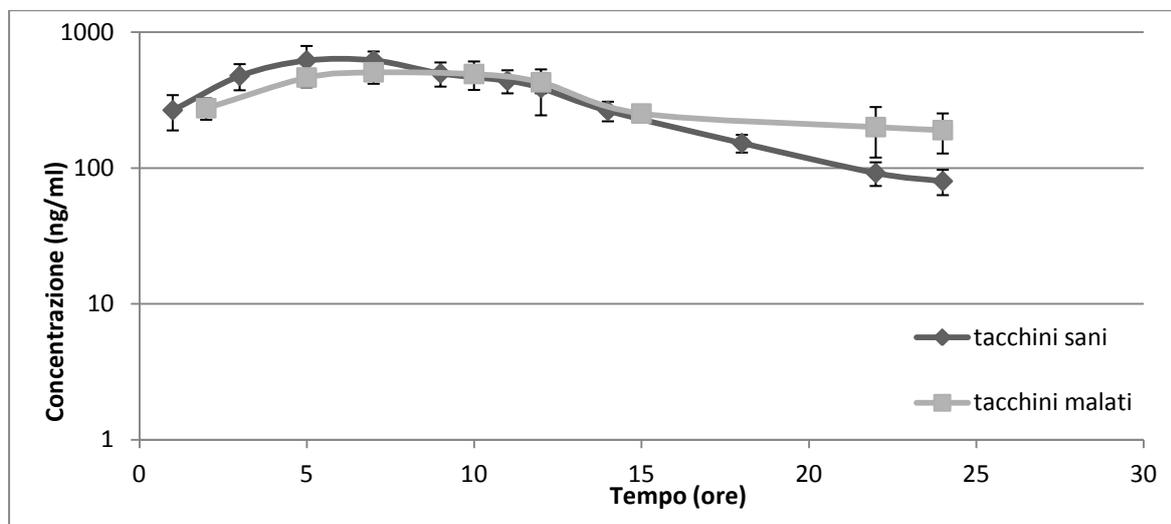


### **Studio di cinetica 10 mg/kg : tacchini sani e malati**

Il peso dei tacchini sani all'inizio della prova era compreso tra 6,1 e 7,9 kg, mentre quello degli animali malati era compreso tra 3,5 e 4,6 kg. Valutando il peso dei tacchini e l'acqua assunta, per raggiungere la dose di 10 mg/kg/die, è stata utilizzata una concentrazione di 89 µg/mL nel gruppo di soggetti sani e di 71 µg/mL in quello dei tacchini malati. L'assunzione di acqua è rimasta costante prima, durante e dopo il trattamento in tutti i gruppi.

Le curve di concentrazione tempo dipendenti dell'Enrofloxacin relative al quinto giorno di trattamento nei soggetti sani e malati sono riportate in figura 2.19, mentre i parametri farmacocinetici  $T_{max}$ ,  $C_{max}$  e AUC sono riportati in tabella 2.10. Dall'analisi statistica non sono emerse differenze significative tra i dati relativi ai due gruppi ( $P > 0,05$ ). Anche in questo caso non sono stati riportati dati relativi alla Ciprofloxacin perché la quantità presente nel siero era in quasi tutti i campioni al di sotto del LOQ.

**Figura 2.19** Curve di concentrazione sierica media tempo dipendenti dell'Enrofloxacin al quinto giorno di trattamento a 10 mg/kg in tacchini sani a malati.



**Tabella 2.10** Parametri farmacocinetici del quinto giorno di trattamento dei tacchini sani trattati con 4,3 mg/kg, dei tacchini sani trattati con 10 mg/kg e dei tacchini malati trattati con 10 mg/kg.

	Tacchini sani 4.3 mg/kg (media ± DS)	Tacchini sani 10 mg/kg (media ± DS)	Tacchini malati 10 mg/kg (media ± DS)
$C_{max}$ (ng/mL)	395.94 ± 61.24 <sup>ab*</sup>	673.09 ± 186.18 <sup>a*</sup>	543.50 ± 68.75 <sup>b*</sup>
$T_{max}$ (h)	7.44 ± 1.67	6.86 ± 2.48	9 ± 1.55
$AUC_{0-24}$ (h·ng/mL)	5530.78 ± 1288.58 <sup>ab*</sup>	7374.53 ± 1067.64 <sup>a*</sup>	7656.95 ± 1460.61 <sup>b*</sup>

\* <sup>a</sup> e <sup>b</sup> indicano le coppie di valori che presentano differenze statisticamente significative (P<0,05).

Le differenze tra i parametri farmacocinetici del gruppo trattato con 4,3 mg/kg e quelle dei due gruppi trattati con 10 mg/kg sono statisticamente significative nel caso di  $C_{max}$  (395,94 ± 61,24 ng/mL vs 673,09 ± 186,18 ng/mL, P<0,01) e AUC (5530,78 ± 1288,58 h·ng/mL vs 7374,53 ± 1067,64 h·ng/mL, P<0,05) ma non nel caso di  $T_{max}$  (7,44 ± 1,67 h vs 6,86 ± 2,48 h).

Nel gruppo dei soggetti sani tre tacchini presentano un picco secondario di Enrofloxacin dopo il termine del trattamento. Lo stesso accade in tre soggetti del gruppo di animali malati.

### 2.3.3. Materiali e metodi dello studio di farmacodinamica

#### **Determinazione della MIC**

Ottantanove ceppi di APEC isolati in campo da tacchini nel periodo 2009-2010 sono stati gentilmente forniti dai laboratori diagnostici dell'Agricola Tre Valli (Verona, Italia).

La determinazione delle MIC è stata eseguita col metodo della microdiluzione in brodo seguendo il protocollo previsto dal manuale M31-A NCCLS (2002). Sono stati utilizzati come ceppi di controllo *Escherichia coli* ATCC 25922 (Remel, Lenexa, KS, USA) e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Remel, Lenexa, KS, USA), come previsto dal manuale NCCLS.

Sono state valutate concentrazioni scalari da 0,001 a 256 mg/L.

### 2.3.4. Risultati dello studio di farmacodinamica

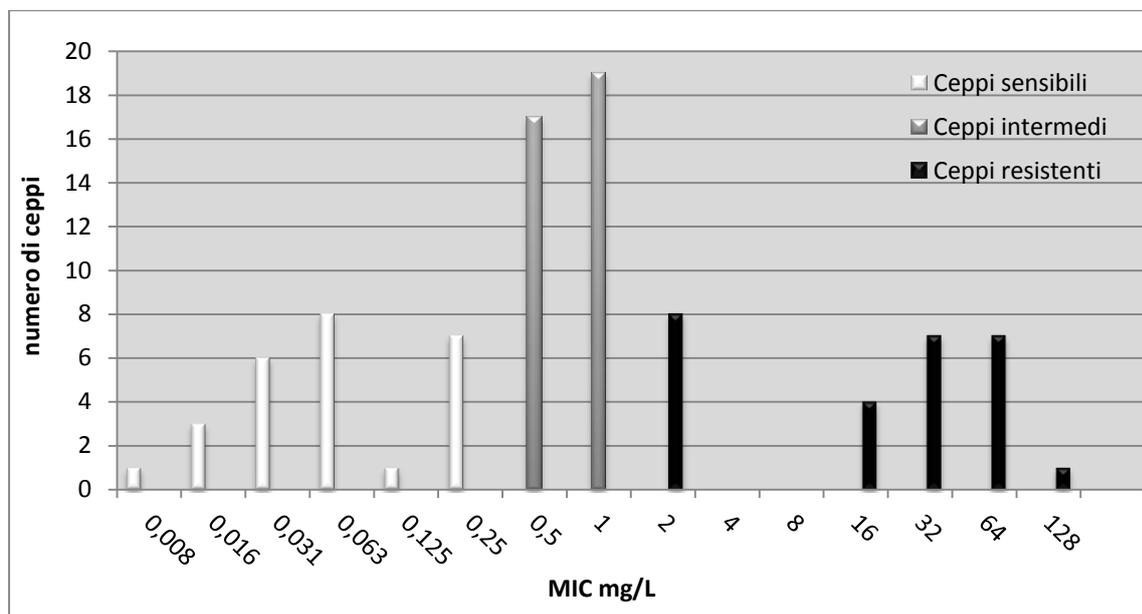
#### **Determinazione della MIC**

La MIC dell'Enrofloxacin nei confronti degli 89 ceppi di campo di *E. coli* è riportata in tabella 2.11 e illustrata in figura 2.20, la classificazione in sensibili, intermedi e resistenti è stata effettuata seguendo i *breakpoint* riportati nei manuali NCCLS. Le MIC si trovano in un range che va da 0,008 mg/L a 128 mg/L; i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> sono rispettivamente di 1 mg/L e 32 mg/L.

**Tabella 2.11** Classificazione dei ceppi in funzione dei valori di MIC.

MIC	n° ceppi	% ceppi	categoria	% categoria
128	1	1,12	resistenti	30,34
64	7	7,87		
32	7	7,87		
16	4	4,49		
8	0	0,00		
4	0	0,00		
2	8	8,99		
1	19	21,35	intermedi	40,45
0,5	17	19,10		
0,25	7	7,87	sensibili	29,21
0,125	1	1,12		
0,063	8	8,99		
0,031	6	6,74		
0,016	3	3,37		
0,008	1	1,12		
totale	89	100		

**Figura 2.20** Frequenza di distribuzione delle MIC dell'Enrofloxacin nei confronti di 89 ceppi di campo di APEC.



### 2.3.5. Analisi dei risultati mediante un modello PK/PD

I parametri cinetici dei tre studi condotti sono stati confrontati con i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> della popolazione analizzata e con l'ultimo valore considerato sensibile dai *breakpoint* NCCLS (0,25 mg/L).

Il valore dei parametri PK/PD considerati predittivi per i fluorochinoloni è riportato in tabella 2.12. (scwar vb)

**Tabella 2.12** Indici PK/PD ottenuti nei tre diversi studi

		Tacchini sani 4.3 mg/kg	Tacchini malati 10 mg/kg	Tacchini sani 10 mg/kg
AUC/MIC	MIC <sub>90</sub> (32 mg/mL)	0,17	0,24	0,23
	MIC <sub>50</sub> (1 mg/mL)	5,53	7,66	7,37
	NCCLS <i>breakpoint</i> 0,25 mg/L	22,12	30,63	29,5
C <sub>max</sub> /MIC	MIC <sub>90</sub> (32 mg/mL)	0,01	0,02	0,02
	MIC <sub>50</sub> (1 mg/mL)	0,39	0,54	0,67
	NCCLS <i>breakpoint</i> 0,25 mg/L	1,58	2,17	2,69

### 2.3.6. Discussione

La via di somministrazione orale in acqua di abbeverata è quella più utilizzata in avicoltura, tuttavia può presentare dei problemi, infatti un elevato numero di fattori influenzano la quantità di acqua assunta dagli animali: scala gerarchica, dimensione del gruppo, sesso, età, peso, specie, attitudine, condizioni di allevamento e condizioni sanitarie. Prima di iniziare una terapia è quindi necessario valutare il peso medio dei soggetti, la quantità di acqua assunta e adeguare la concentrazione di farmaco in modo da raggiungere il dosaggio desiderato. È inoltre opportuno monitorare eventuali modifiche dell'abbeverata durante il trattamento, alte concentrazioni di farmaco o cambiamenti delle condizioni ambientali potrebbero far variare l'assunzione di acqua da parte del gruppo.

Sàrközi *et al.* (2004) avevano riportato delle modificazioni farmacocinetiche del Norfloxacin cambiando lo schema di somministrazione orale da continua a pulsata sia nei polli che nei tacchini. In letteratura per quanto riguarda l'Enrofloxacin sono presenti dati riguardanti solo le vie di somministrazione endovenosa in bolo e orale in bolo (Dimitrova *et al.*, 2007). Data la mancanza di informazioni sulla somministrazione orale pulsata in acqua di abbeverata nel tacchino, nel presente studio è stato valutato il comportamento cinetico dell'Enrofloxacin nel tacchino in condizioni il più possibile simili a quelle di campo assieme alla cinetica del farmaco in corso di colibacillosi sistemica.

Sono state effettuate due sperimentazioni su soggetti sani: nella prima è stata fornita acqua medicata alla concentrazione di 50 µg/mL, ossia la concentrazione più idonea a raggiungere il dosaggio di 10 mg/kg secondo quanto riportato nel foglietto illustrativo; mentre nella seconda la concentrazione per raggiungere i 10 mg/kg è stata calcolata sulla base del peso degli animali e del loro consumo di acqua nei giorni precedenti.

Durante il primo studio sono stati effettuati i prelievi sia il primo giorno che l'ultimo e non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nei parametri cinetici considerati, la veloce escrezione del farmaco fa sì infatti che non si verificano fenomeni di accumulo durante la terapia.

La presenza di picchi secondari di Enrofloxacin dopo il termine della somministrazione della terapia indica che i tacchini hanno assunto il principio attivo dopo che l'acqua medicata era stata rimossa, l'ipotesi più probabile è

che essi l'abbiano ingerita con le feci. La coprofagia è una stereotipia alimentare che può verificarsi nel tacchino e che durante lo studio era stata notata soprattutto nei soggetti meno pesanti e quindi probabilmente più in basso nella scala gerarchica. Questo comportamento e la presenza dei picchi di Enrofloxacin dopo il termine del trattamento è stata notata in tutti e tre i gruppi. La presenza di questa stereotipia non inficia la prova condotta, ma, trattandosi di un comportamento che si può sviluppare anche in allevamento in quanto legato allo stress degli animali, mette in evidenza un aspetto che con gli studi di farmacocinetica classici in gabbia metabolica non sarebbe emerso. Per verificare questa ipotesi sarebbero tuttavia necessari ulteriori studi riguardanti l'entità del fenomeno e la quantificazione e la stabilità del principio attivo nelle feci.

La concentrazione del farmaco utilizzata nel primo studio (50 µg/mL) corrisponde di fatto a una dose di 4,3 mg/kg, meno della metà della dose prevista. Questo si riflette sui parametri farmacocinetici  $C_{max}$  (395,94 ± 61,24 ng/mL) e AUC (5530,78 ± 1288,58 h·ng/mL) che risultano ben distanti da quelli raggiunti con la dose 10 mg/kg.

L'utilizzo della concentrazione fissa si è rivelato non solo inutile, ma anche pericoloso, in quanto non risulta efficace contro gli APEC ma contribuisce a selezionare le sottopopolazioni che presentano fattori di resistenza.

Sebbene oggi gli allevatori utilizzino sempre meno le concentrazioni fisse in acqua di abbeverata, ma tendano ad adattarle alle necessità in campo, in passato questo metodo era molto utilizzato e potrebbe aver favorito l'incremento di antibiotico-resistenza più volte riportato in letteratura e riscontrato anche in occasione di questo studio.

Le concentrazioni di Enrofloxacin necessarie in questo studio per raggiungere i 10 mg/kg sono state rispettivamente di 89 µg/mL per i tacchini sani e 71 µg/mL per quelli malati. Nonostante questo notevole incremento nella concentrazione del farmaco, durante la terapia non si sono riscontrate modifiche nell'assunzione di acqua, e questo fa supporre che non ci siano state modificazioni di palatabilità dell'acqua.

Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i parametri farmacocinetici dei tacchini sani e di quelli malati. La colibacillosi coinvolge prevalentemente i tessuti del tratto respiratorio (trachea, polmoni e sacchi

aerei), il fegato e altri organi viscerali, ma non il rene. Dimitrova *et al.* (2007) avevano già riscontrato che la conversione dell'Enrofloxacin a Ciprofloxacina nel fegato è trascurabile, dato confermato da questo studio, le lesioni epatiche dovute agli APEC non influenzano quindi il metabolismo del farmaco. Per quanto riguarda l'escrezione essa non viene modificata in quanto è esclusivamente renale e il rene non viene colpito da colibacillosi. L'assenza di differenze tra i parametri cinetici dei soggetti sani e di quelli malati è quindi in accordo con gli studi di Hwang *et al.* (2009) che riportavano nel ratto un'alterazione della *clearance* dell'Enrofloxacin solo in corso di insufficienza renale, ma non in corso di insufficienza epatica.

Per definire la dose ottimale di Enrofloxacin per il trattamento della colibacillosi nel tacchino da carne i parametri farmacocinetici ottenuti mediante somministrazione orale pulsata in soggetti sani e malati sono stati confrontati con le MIC di 89 ceppi di APEC isolati da allevamenti commerciali di tacchini in Italia nel 2009 e 2010.

I valori di MIC ottenuti si trovano tra 128 mg/L e 0,008 mg/L, presentano una distribuzione bimodale in cui si evidenzia una sottopopolazione altamente resistente (MIC > 8 mg/L). Il trend di incremento di resistenza iniziato negli anni '80 con l'introduzione in commercio del farmaco e già riportato da numerosi studi effettuati su APEC e AFEC isolati da avicoli (White *et al.*, 2000; Van den Bogaard *et al.*, 2001; Ozawa *et al.*, 2010; EFSA, 2010) viene confermato anche in questo studio dall'elevata percentuale di ceppi intermedi (40%).

L'elevata percentuale di ceppi resistenti (30,3%) impone nell'allevamento del tacchino da carne un utilizzo attento dell'Enrofloxacin che non può essere somministrata se non in presenza di un test di sensibilità che attesti la sua efficacia nei confronti dell'APEC da trattare. Direttive analoghe sono già state fornite sia dall'EFSA (2006) che dal WHO (2011) nelle ultime linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici.

L'aumento di antibiotico-resistenza in *E. coli* isolati da tacchino rappresenta un rischio legato non solo alla salute animale ma anche alla salute pubblica. Come riportato da Aarestrup e Wegener (1999), AFEC e APEC antibiotico-resistenti possono contaminare le carcasse avicole destinate al consumo umano e, sebbene non patogeni, colonizzare l'intestino umano per un periodo di tempo

sufficiente a trasferire i loro geni di resistenza alla popolazione batterica residente e a eventuali patogeni presenti. Data la notevole somiglianza delle molecole di Enrofloxacin e Ciprofloxacin il fenomeno della cross-resistenza è molto elevato, batteri che sviluppano resistenza verso l'Enrofloxacin sono quindi resistenti anche alla Ciprofloxacin, principio attivo usato in medicina umana (EFSA, 2006).

I due parametri considerati maggiormente correlati all'efficacia clinica dei fluorochinoloni sono il rapporto  $C_{max}/MIC$  e il rapporto  $AUC/MIC$  (AliAbadi *et al.*, 2003; Rybak, 2006; Toutain *et al.*, 2002). Diversi autori considerano la terapia a base di Ciprofloxacin efficace solo quando il rapporto  $C_{max}/MIC$  è superiore a 10 e il rapporto  $AUC/MIC$  è superiore a 100 o a 125 (Forrest *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 2000; Scaglione, 2002). Nonostante non siano stati definiti *breakpoint* specifici per la colibacillosi aviaria, numerosi studi PK/PD veterinari utilizzano sia per gli avicoli (Ozawa *et al.*, 2010; Dimitrova *et al.*, 2007; Anadón *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2010) che per altre specie (Toutain *et al.*, 2002; McKellar *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 2005) 8 o 10 per il rapporto  $C_{max}/MIC$  e 100 per il rapporto  $AUC/MIC$  per definire la dose minima atta a prevenire l'insorgenza di antibiotico-resistenza.

Come riportato in tabella 2.12, i rapporti  $AUC/MIC$  e  $C_{max}/MIC$  ottenuti utilizzando la  $MIC_{50}$  e la  $MIC_{90}$  della nostra popolazione di APEC sono ben al di sotto dei *breakpoint* di efficacia. Dimitrova *et al.* (2007) avevano sostenuto l'efficacia del trattamento con Enrofloxacin a 10 mg/kg in bolo orale utilizzando una  $C_{max}$  1228 µg/L, una  $AUC$  16130 h·µg/L e una  $MIC_{90}$  di 0,06 mg/L. Se gli stessi parametri farmacocinetici vengono confrontati con la  $MIC_{90}$  (32 mg/L) del presente studio tale dosaggio risulta invece inefficace ( $C_{max}/MIC$  0,04;  $AUC/MIC$  0,50).

Inoltre se si confrontano i parametri farmacocinetici ottenuti da Dimitrova *et al.* (2007) col *breakpoint* di sensibilità riportato nel manuale NCCLS M31-A2 del 2002 (0,25 mg/L) la terapia a 10 mg/kg riesce a raggiungere i *breakpoint* richiesti solo se somministrata in bolo per via endovenosa ( $C_{max}/MIC$  11,74 e  $AUC/MIC$  95,04). Il bolo orale risulta inefficace ( $C_{max}/MIC$  4,91 e  $AUC/MIC$  64,52), come anche la somministrazione pulsata valutata in questo studio. Da quanto riportato si può concludere che non solo il dosaggio 10 mg/kg per via orale è attualmente inefficace, ma contribuisce alla diffusione del fenomeno

dell'antibiotico-resistenza. Per migliorare l'efficacia di questa terapia, e in accordo con le linee guida sull'uso prudente e responsabile degli antimicrobici nelle specie animali destinate al consumo umano, la dose di Enrofloxacin andrebbe aumentata e lo schema di somministrazione rivalutato.

## **2.4. Verifica dell'adeguatezza del tempo di sospensione stabilito per l'Enrofloxacin**

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il tempo di sospensione dell'Enrofloxacin somministrata alla dose di 10 mg/kg *die* con somministrazione pulsata in acqua di abbeverata per 5 giorni nei tacchini da carne.

Gli studi di questa fase sono stati eseguiti sugli stessi animali utilizzati per le prove di farmacocinetica *in vivo* e sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Padova (numero del progetto 55/2009)

### **2.4.1. Materiali e metodi**

#### ***Sperimentazione in vivo***

Dieci tacchini maschi di 40 giorni, sani sulla base di un esame clinico, sono stati selezionati da un allevamento industriale di tacchini ibridi da carne, facente parte del gruppo Agricola Tre Valli (Verona, Italia). I tacchini sono stati stabulati in gruppo, in una voliera di 4 mq con accesso libero a acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini in accrescimento).

Dopo un periodo di acclimatamento di 16 giorni, ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile.

A partire da 3 giorni prima dell'inizio del trattamento è stata misurata giornalmente la quantità di acqua consumata dai tacchini tra le 8.00 e le 18.00. I tacchini sono stati trattati con Enrofloxacin (Baytril 10% O. L., Bayer, Milano, Italy) per via orale secondo uno schema di tipo pulsato somministrando acqua medicata dalle 8.00 alle 18.00 per 5 giorni. La concentrazione utilizzata (89 µg/mL) è stata calcolata sulla base della quantità di acqua consumata il giorno precedente e del peso dei tacchini, in modo da raggiungere il dosaggio autorizzato di 10 mg/kg *die*.

Finito il trattamento si è atteso il tempo di sospensione autorizzato di 3 giorni e successivamente sono stati sacrificati gli animali. Durante la necropsia

eseguita su ogni animale sono stati prelevati i campioni dei tessuti previsti dalla normativa (muscolo, cute più grasso, fegato e rene).

In particolare per la matrice muscolo è stata prelevata una porzione del muscolo pettorale superficiale; per la matrice cute più grasso è stata selezionata una porzione di cute dalla parte alta del petto e dal collo in modo che non fosse inquinata da materiale fecale, spiumata, sciacquata e prelevata, il grasso è stato prelevato dalla porzione intraddominale per evitare contaminazioni; fegato e reni sono stati prelevati interi. Tutte le matrici sono state omogenate, suddivise in aliquote da 1 g e conservate a -80°C in attesa di essere analizzate.

### **Analisi dei campioni**

Le analisi dei campioni delle diverse matrici prelevati per la quantificazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina sono state effettuate come descritto al paragrafo 2.2.

#### **2.4.2. Risultati**

Nella tabella 2.13 sono riportati, per ogni tacchino, il numero di identificazione, il peso al momento del sacrificio e la somma delle concentrazioni di Ciprofloxacina e Enrofloxacin nelle matrici previste per legge (muscolo, cute più grasso, rene e fegato), è riportato inoltre il valore di LMR stabilito per legge che si riferisce alla somma dei due principi attivi.

**Tabella 2.15** Concentrazione di Enrofloxacin e Ciprofloxacina nei diversi tessuti\*.

Tacchino	Peso (kg)	Muscolo (ng/g)	Cute più grasso (ng/g)	Fegato (ng/g)	Rene (ng/g)
1	6,4	non quantificabile	<u>330,43</u>	127,15	<u>512,97</u>
2	6,7	non quantificabile	<u>336,09</u>	185,16	<u>673,48</u>
3	6,7	non quantificabile	<u>272,05</u>	non quantificabile	263,96
4	6,8	non quantificabile	89,37	non quantificabile	<u>586,68</u>
5	7,3	non quantificabile	<u>108,48</u>	non quantificabile	108,42
6	7,4	non quantificabile	59,07	non quantificabile	189,05
7	8,1	non quantificabile	non quantificabile	non quantificabile	236,89
	LMR	100	100	200	300

\*I numeri sottolineati indicano i valori che superano gli LMR

Nelle tabelle 2.14 e 2.15 sono riportati il peso al momento del sacrificio e la concentrazione rispettivamente di Enrofloxacin e Ciprofloxacina espressa in ng/g in muscolo, cute più grasso, fegato e rene.

**Tabella 2.14** Concentrazione di Enrofloxacinina nei diversi tessuti.

Tacchino	Peso (kg)	Muscolo (ng/g)	Cute più grasso (ng/g)	Fegato (ng/g)	Rene (ng/g)
1	6,4	non quantificabile	145,45	17,04	73,19
2	6,7	non quantificabile	278,70	105,54	89,97
3	6,7	non quantificabile	76,69	non quantificabile	22,16
4	6,8	non quantificabile	36,35	non quantificabile	53,70
5	7,3	non quantificabile	77,00	non quantificabile	24,34
6	7,4	non quantificabile	40,34	non quantificabile	32,20
7	8,1	non quantificabile	non quantificabile	non quantificabile	29,24

**Tabella 2.15** Concentrazione di Ciprofloxacina nei diversi tessuti.

Tacchino	Peso (kg)	Muscolo (ng/g)	Cute più grasso (ng/g)	Fegato (ng/g)	Rene (ng/g)
1	6,4	non quantificabile	184,99	110,10	439,78
2	6,7	non quantificabile	57,39	79,62	583,52
3	6,7	non quantificabile	195,37	non quantificabile	241,80
4	6,8	non quantificabile	53,03	non quantificabile	532,98
5	7,3	non quantificabile	31,48	non quantificabile	84,08
6	7,4	non quantificabile	18,73	non quantificabile	156,86
7	8,1	non quantificabile	non quantificabile	non quantificabile	207,65

### 2.4.3. Discussione

Analizzando i dati ottenuti risulta subito evidente che solo i tacchini numero 6 e numero 7 rientrano nei valori ammessi, e che gli altri 5 soggetti presentano residui superiori ai valori di LMR per almeno uno dei tessuti considerati.

In particolare le concentrazioni della matrice cute più grasso sono quelle che più frequentemente (4 tacchini su 7 al di sopra del limite) superano il valore di LMR.

I valori di concentrazione nella matrice cute più grasso sono simili a quelli riscontrati nel rene ma l'escrezione prevalentemente renale e la nota capacità di concentrazione del farmaco in questo tessuto hanno contribuito, al momento della definizione di valori di LMR, ad assegnare valori limite più elevati in questa matrice.

La natura lipofila dell'Enrofloxacinina giustifica in parte la concentrazione più elevata in cute e grasso, che era già stata riportata per il pollo nel Summary Report dell'EMA relativo all'Enrofloxacinina (1998) e in uno studio di Anadón (1995).

Solo recentemente i risultati Mestorino *et al.* (2011) riportati nello studio di deplezione residuale nel pollo hanno evidenziato una concentrazione molto elevata di Enrofloxacinina nelle piume, che potrebbe portare a un aumento di

Enrofloxacin in cute più grasso quando questa matrice viene utilizzata per le analisi di residui includendo i follicoli di piume e penne. Gli autori confermano la capacità di accumulo dei chinoloni nei follicoli. Dati in nostro possesso confermano una evidente discrepanza tra le concentrazioni di Enrofloxacin nella matrice cute più grasso non ripulita dalla presenza dei residui di piumette e di follicoli rispetto a quella accuratamente ripulita (dati non pubblicati).

La persistenza e la possibilità di concentrazione della Ciprofloxacina nella matrice cute più grasso è in contrasto con le basse concentrazioni plasmatiche, riscontrate nella prova di cinetica ematica, ma è in accordo con la sua ridotta produzione epatica e con una *clearance* complessivamente più lenta rispetto a quella dell'Enrofloxacin, come riportato da Dimitrova *et al.* (2007).

Sebbene in assenza di una correlazione lineare, gli animali più leggeri sembrano presentare residui più elevati. La variabilità individuale si presenta infatti molto ampia, e superiore a quella riscontrata nello studio cinetico. Questo potrebbe essere attribuito al fatto che i tacchini più pesanti presentano una percentuale di grasso maggiore e, dato che il farmaco tende ad accumulare nel grasso, può distribuirsi in un volume maggiore. Questa ipotesi tuttavia non spiega perché Enrofloxacin e Ciprofloxacina siano presenti in proporzione variabile nei diversi soggetti, il fattore diluizione dovrebbe infatti influenzare i due principi attivi in egual modo.

Questo potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che i soggetti più leggeri, e quindi più in basso nella scala gerarchica, presentano una stereotipia alimentare per cui ingeriscono le feci e con esse il principio attivo. Questo comportamento è già stato osservato in occasione dello studio di cinetica ematica e potrebbe aver influito sulla quantità di residui distribuiti nei tessuti e riscontrata al termine della prova. Durante lo studio cinetico le concentrazioni di Enrofloxacin nel plasma dei tacchini 1 e 2 presentavano picchi secondari successivi al termine della terapia, si tratta dei due tacchini più leggeri e con il livello di residui più elevato. Per verificare questa ipotesi sono però necessari ulteriori studi sulla entità di eliminazione dell'Enrofloxacin nelle feci, sulla sua stabilità e sull'importanza del fenomeno della coprofagia nel tacchino stressato.

In conclusione il tempo di sospensione di 3 giorni appare inadeguato per ottenere residui inferiori al valore di LMR, per lo meno nelle condizioni sperimentali da noi riportate. Un risultato simile era stato riscontrato nel pollo sia da Mestorino *et al.* (2011) che suggerivano di adottare un tempo pari a 7 giorni, sia da Anadón *et al.* (1995).

## **2.5. Discussione e conclusioni**

Dagli studi effettuati è emerso un notevole innalzamento del livello di antibiotico-resistenza nelle popolazioni di APEC attualmente circolanti negli allevamenti di tacchini da carne localizzati nella zona del Nord Italia da noi studiata.

Di conseguenza risulta evidente anche l'inadeguatezza della terapia 10 mg/kg *die* attualmente autorizzata per l'Enrofloxacin. Non solo, anche il suggerimento di utilizzo del prodotto a 50 µg/mL nell'acqua di abbeverata, sebbene non caldeggiato, può contribuire ad un sottodosaggio del farmaco. Inoltre l'inadeguatezza può essere considerata duplice, sia sotto l'aspetto clinico che sotto quello di sicurezza alimentare. Da un lato il dosaggio previsto risulta insufficiente per eradicare il patogeno, anche modificando le concentrazioni nell'acqua, dall'altro i residui che restano nei tessuti destinati al consumo umano sono più elevati di quanto atteso e in contrasto con le più elementari norme di sicurezza del consumatore.

Ne consegue quindi la necessità di un riesame delle posologie, dello schema di trattamento e una nuova definizione di tempi di sospensione adeguati.



### **3. Studio della cinetica e dell'efficacia del Florfenicolo a diverse posologie e condizioni ambientali**

#### **3.1. Scopo del lavoro**

*Ornithobacterium rhinotracheale* è un batterio emergente che causa ingenti danni economici in avicoltura. I dati sulla sensibilità di questo patogeno ai farmaci normalmente impiegati nell'allevamento avicolo sono poco incoraggianti. Emerge quindi la necessità di definire dei nuovi protocolli terapeutici per il trattamento di questa patologia.

Non ci sono dati reperibili in letteratura sull'efficacia *in vitro* del Florfenicolo nei confronti dell'*O. rhinotracheale*, nel presente studio è stata valutata la sensibilità del batterio al farmaco ai fini di autorizzare una nuova indicazione terapeutica per il principio attivo. Lo scarso impiego del Florfenicolo nel comparto avicolo fa presupporre un basso livello di resistenza.

In letteratura sono presenti dati contrastanti sulla cinetica ematica del Florfenicolo nel tacchino si è quindi deciso di valutare se parametri ambientali quali il fotoperiodo e il momento di assunzione dell'alimento potevano andare ad interferire con la cinetica del farmaco.

Questa parte del lavoro è stata svolta presso l'Università di Gent sotto la guida del prof. De Backer (UGent faculteit Diergeneeskunde Vakgroep Farmacologie en Toxicologie).

#### **3.2. Validazione del metodo analitico**

Per poter effettuare gli studi di cinetica è stato necessario allestire un metodo analitico in grado di quantificare Florfenicolo e Florfenicolamina, un suo probabile derivato di degradazione che può essere ritrovato nel plasma.

Le prove preliminari per la selezione del metodo analitico sono state svolte in precedenza e non sono oggetto di questa tesi. Sulla base dei dati ottenuti dalle prove preliminari è stato selezionato un metodo analitico che fosse in grado di soddisfare le richieste dello studio di farmacocinetica. La quantificazione è stata condotta con un metodo in spettrometria di massa preceduto da

un'estrazione liquido-liquido. Tutta la procedura analitica è stata validata come da normativa (Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE).

Dato che gli studi di cinetica sarebbero stati condotti su tacchini da carne di giovane età non era possibile prelevare grandi quantità di plasma, la necessità di partire da campioni quantitativamente ridotti ha fatto optare per un sistema di quantificazione molto sensibile quale la spettrometria di massa.

### **3.2.1. Materiali e metodi**

#### ***Composti chimici e reagenti***

Florfenicolo (grado di purezza >99%) è stato acquistato dalla ditta Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Tiamfenicolo, quale standard interno, è stato acquistato da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Florfenicolamina è stata acquistata da Orotech (Temse, Belgium). Metanolo, acqua, idrossido di sodio in pellet, acido acetico ed etilacetato sono tutti di grado analitico e sono stati acquistati da VWR (Leuven, Belgium). Acqua (UPLC grade) ed acetonitrile (UPLC grade) sono stati acquistati da Biosolve (Volkenwaard, The Netherlands)

#### ***Attrezzature***

La strumentazione utilizzata è la seguente: bilance analitiche AX205 e PB1502-L Mettler-Toledo (Wechelderzande, Belgium), matracci, l'Handy-step, provette in vetro, provette in plastica da 15 mL (Falcon), pipette calibrate e puntali Novolab (Geraadsbergen, Belgium), pH-metro pH 330i VWR (Leuven, Belgium), centrifuga Allegra X-15R Centrifuge Beckman & Coulter (Suarlée, Belgium).

#### ***Soluzioni madre e soluzioni di lavoro***

Le soluzioni madre 1000 µg/mL di Florfenicolo, Florfenicolamina e Tiamfenicolo sono state preparate sciogliendo in metanolo un'appropriata quantità di standard analitico in polvere e sono state conservate a +4°C.

Le soluzioni di lavoro sono state preparate diluendo appropriate quantità di soluzione madre di ogni analita con metanolo in modo da ottenere per Florfenicolo e Florfenicolamina soluzioni alle concentrazioni di: 400, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 0,25 e 0,1 µg/mL. La soluzione madre di

Tiamfenicolo è stata diluita opportunamente con metanolo per ottenere una soluzione di lavoro alla concentrazione di 50 µg/mL.

### ***Standard di calibrazione***

Standard di calibrazione a concentrazione nota di Florfenicolo e Florfenicolammina in plasma (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 µg/mL) sono stati preparati aggiungendo a 225 µL di plasma bianco 12,5 µL di soluzione di lavoro a concentrazione appropriata. La stabilità dell'analita nel plasma conservato a -80°C era già stata confermata per 27 giorni.

### ***Metodi di estrazione***

Aliquote di 250 µL di plasma sono state trasferite in Falcon da 15 mL, ai campioni sono stati addizionati 12,5 µL di soluzione di lavoro di Tiamfenicolo standard interno). Dopo agitazione per 15 secondi e riposo per 5 min sono stati aggiunti 100 µL di idrossido di sodio 1M, il campione è stato agitato 15 s e sono stati aggiunti 4 mL di etilacetato. I campioni sono stati posti in un agitatore per 20 min e poi centrifugati a 4000 rpm (pari a 7650 g) per 10 min. Il surnatante è stato prelevato, trasferito in una provetta di vetro e portato a secco a 40°C in corrente d'azoto. Il campione è stato risospeso con 250 µL di una soluzione 0,01M di acido acetico in acqua a pH4 e acetonitrile (80/20, v/v) e filtrato.

### ***Metodo analitico in LCMS***

Le condizioni cromatografiche e quelle analitiche in massa sono state riprese e modificate da protocolli già validati presso i laboratori analitici dell'Università di Gent (UGent faculteit Diergeneeskunde onderzoeksgroep Farmacologie en Toxicologie SOP ANAL-101.C e SOP ANAL-133.E)

Per quantificare Florfenicolo e Florfenicolammina è stato utilizzato un sistema LC-MS/MS composto da: Finnigan Surveyor Autosampler plus, Finnigan Surveyor MS Pump plus e Finnigan TSQ Quantum Ultra acquistati da Thermo Electron Corporations (Zellik, Belgium).

L'autocampionatore è stato mantenuto ad una temperatura di 15°C. La separazione cromatografica è stata effettuata mediante colonna Hypersil Gold 1,9 µm 50x2,1mm i.d. accoppiata a una precolonna Hypersil Gold 3 µm 10x2,1mm i.d. Thermo Scientific (Zellik, Belgium), mantenute a una

temperatura di 45°C. Il volume di iniezione adottato era 10 µL. La fase mobile era composta da acido acetico 1% pH 4 (soluzione A), acetonitrile (soluzione B) in percentuale variabile, le caratteristiche del gradiente sono riportate in tabella 3.1. Il flusso era di 300 µL/min.

**Tabella 3.1** Gradiente di eluizione utilizzato per l'analisi di Florfenicolo, Florfenicolammina e Tiamfenicolo.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Flusso (µL/min)</b>	<b>A* %</b>	<b>B* %</b>
<b>0</b>	300	85	15
<b>2.20</b>	300	85	15
<b>2.50</b>	300	20	80
<b>3.80</b>	300	20	80
<b>4.0</b>	300	85	15
<b>6.0</b>	300	85	15

\*A: acido acetico 1% pH 4, \*B: acetonitrile.

L'identificazione e la quantificazione di Florfenicolo, Florfenicolammina e Tiamfenicolo (standard interno) sono state fatte mediante spettrometro di massa triplo quadrupolo, i cui parametri sono stati impostati come descritto in tabella 3.2.

**Tabella 3.2** Parametri utilizzati per l'identificazione e la quantificazione di Florfenicolo e Florfenicolammina in LC-MS.

<b>Analita</b>	<b>Ione precursore (m/z)</b>	<b>Ioni prodotto (m/z)</b>	<b>Energia di collisione (eV)</b>	<b>Modalità</b>
<b>Florfenicolammina</b>	248	130 230	10	ESI+
<b>Florfenicolo</b>	356	185 336	5	ESI-
<b>Tiamfenicolo</b>	354	185 290	5	ESI-

### **Validazione del metodo**

La validazione del metodo è stata effettuata seguendo il protocollo di validazione dei metodi analitici dei laboratori dell'Università di Gent (UGent faculteit Diergeneeskunde onderzoeksgroep Farmacologie en Toxicologie SOP QUAL-11.L), che si basa sulla "Decisione della Commissione Europea

2002/657/EC che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei dati".

La specificità è stata valutata analizzando 20 matrici bianche e altre matrici bianche a cui erano stati addizionati Florfenicolamina, Florfenicolo e Tiamfenicolo per verificare l'assenza di picchi al tempo di ritenzione degli analiti di interesse.

La curva di calibrazione per il siero è stata preparata utilizzando nove standard di calibrazione nel range 5-5000 ng/mL sia per la Florfenicolamina che per il Florfenicolo e scegliendo l'equazione che meglio si adattava ai risultati ottenuti. Per questa valutazione sono stati presi in considerazione sia il coefficiente di correlazione ( $r^2$ ) che il coefficiente di "goodness-of-fit" (g) calcolato con la seguente formula:

$$g = \sqrt{\frac{\sum(\% \text{ deviazione})^2}{n-1}} \quad \text{dove } \% \text{ deviazione} = \frac{\text{concentrazione calcolata} - \text{valore nominale}}{\text{valore nominale}}$$

Questo coefficiente non deve superare il valore del 20%.

Accuratezza e precisione sono state valutate tramite analisi degli standard di calibrazione. L'accuratezza e la precisione sono state valutate attraverso i risultati delle analisi di 6 standard di calibrazione per ogni concentrazione scelta, sono stati valutati tre livelli di concentrazione, uno vicino al LOQ, uno al centro della curva di calibrazione e uno nella parte alta della curva di calibrazione. L'accuratezza è stata valutata come deviazione percentuale secondo la formula vista sopra. I criteri di validazione sono: non più del 50% dei campioni con concentrazione inferiore ad 1 ng/mL deve presentare una deviazione superiore al 20%, non più del 30% dei campioni con concentrazione compresa tra 1 ng/mL e 10 ng/mL deve presentare una deviazione superiore al 10%, non più del 10% dei campioni con concentrazione superiore ad 10 ng/mL deve presentare una deviazione superiore al 10%.

La precisione, calcolata come deviazione standard relativa (RDS), deve essere inferiore al valore individuato dalla formula:  $RDS = 2^{(1-0,5 \log C)} \times 2/3$  dove C rappresenta la concentrazione teorica in grammi.

Il limite di identificazione (LOD) è stato calcolato come media analitica del rumore di fondo di 20 bianchi più 3 volte la sua deviazione standard (DS). Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato come media analitica del

rumore di fondo di 20 bianchi più 10 DS. La concentrazione così calcolata viene confermata nel caso rispetti i criteri di precisione e accuratezza, in caso contrario viene scelto il valore minimo che soddisfa tali requisiti.

La stabilità dei principi attivi utilizzati era già stata studiata presso i laboratori dell'Università di Gent. Le soluzioni madre e le soluzioni di lavoro conservate a +4°C sono stabili nel caso del Florfenicolo e della Florfenicolamina per almeno 9 mesi e nel caso del Tiamfenicolo per 111 giorni. La stabilità del Florfenicolo e della Florfenicolamina è di 27 giorni in campioni di plasma conservati a -80°C.

Il recupero non è stato calcolato, in quanto utilizzando un opportuno standard interno addizionato costantemente alla matrice, e calcolando la concentrazione degli analiti in relazione al rapporto tra la loro area e quella dello standard interno, eventuali perdite in fase di estrazione vengono compensate sulla base della riduzione della risposta dello standard interno.

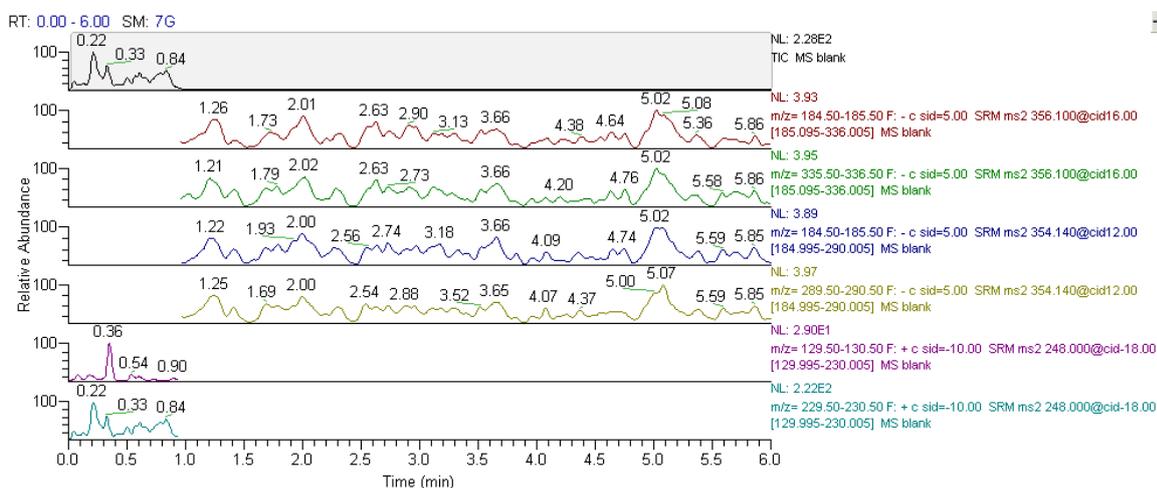
### 3.2.2. Risultati

La durata completa della corsa era di 6 minuti. I tempi di ritenzione della Florfenicolamina e del Florfenicolo sono stati rispettivamente 0,6 min e 2,9 min. Il tempo di ritenzione del Tiamfenicolo, standard interno, era di 1,3 min.

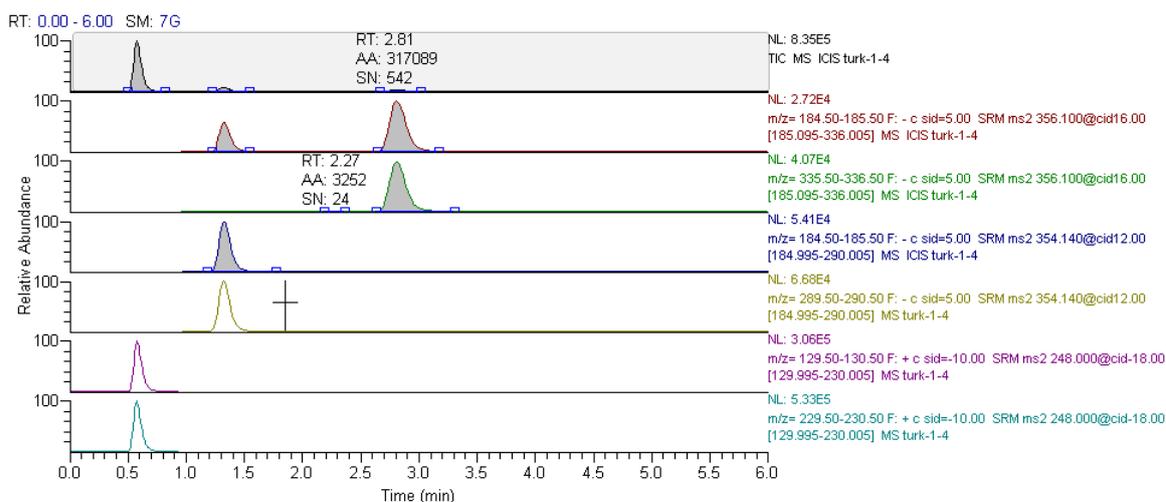
#### **Specificità**

La specificità del metodo è stata confermata dall'assenza di interferenti con lo stesso tempo di ritenzione dei composti di interesse come illustrato nelle figure 3.1 e 3.2.

**Figura 3.1** Cromatogramma di un campione bianco di plasma.



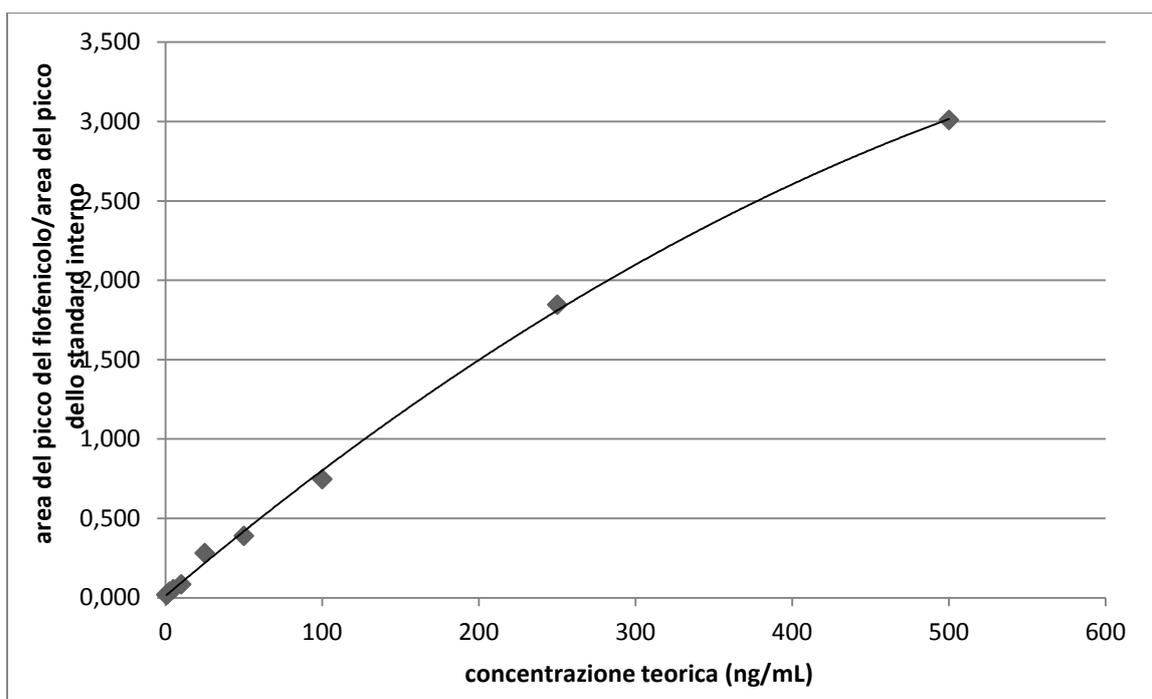
**Figura 3.2** Cromatogramma di uno standard di calibrazione.



### Curva di calibrazione

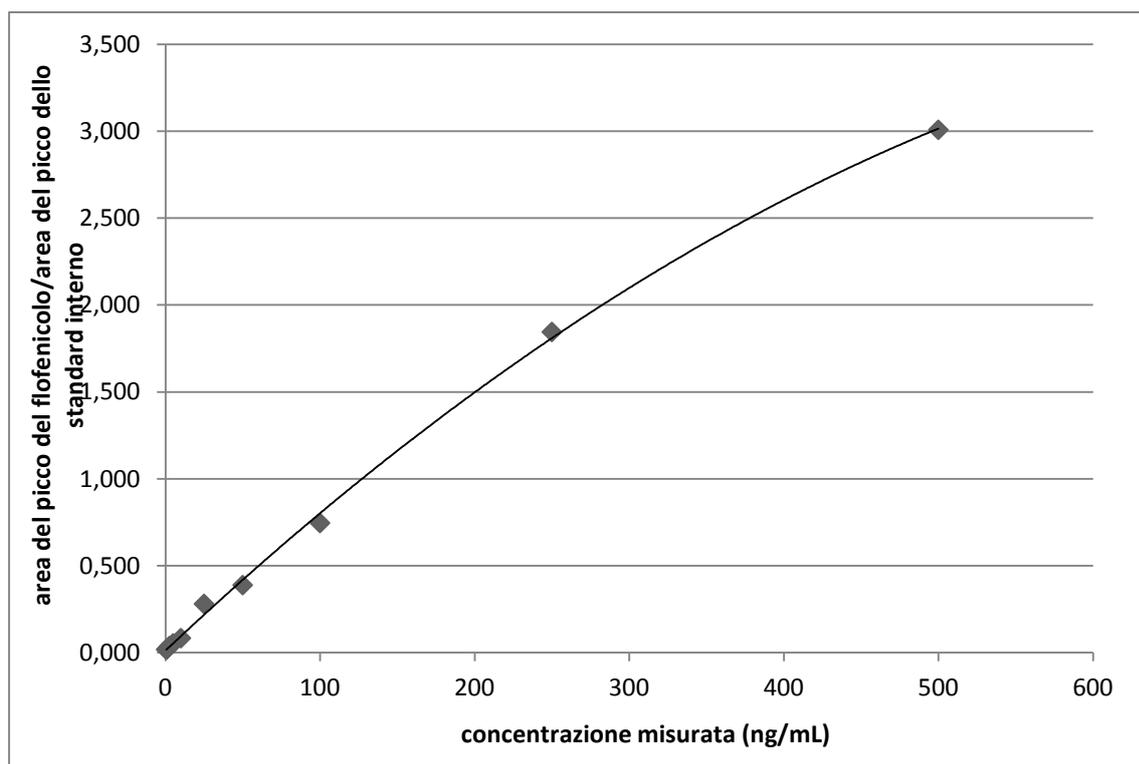
La curva di calibrazione che meglio descrive la relazione tra le concentrazioni teoriche degli standard interni e il rapporto tra l'area degli standard di calibrazione e l'area dello standard interno, ottenuti per il Florfenicolo è una curva polinomiale di secondo grado (figura 3.3) rappresentata dalla seguente equazione:  $y = -4,36x^2 + 0,01x + 0,02$ . La buona correlazione è confermata dal valore di  $r^2$ , pari a 0,99, e dal valore di  $g$ , pari a 14,25%.

**Figura 3.3** Curva di calibrazione del Florfenicolo.



La curva di calibrazione che meglio descrive la relazione tra le concentrazioni teoriche degli standard interni e il rapporto tra l'area degli standard di calibrazione e l'area dello standard interno, ottenuti per la Florfenicolamina è una curva polinomiale di secondo grado (figura 3.4) rappresentata dalla seguente equazione:  $y = -3,83x^2 + 0,01x + 0,01$ . La buona correlazione è confermata dal valore di  $r^2$ , pari a 0,99, e dal valore di  $g$ , pari a 17,92%.

**Figura 3.4** Curva di calibrazione della Florfenicolamina.



Nella tabella 3.3 sono riportati i risultati della precisione, espressa come deviazione standard relativa (RDS), e dell'accuratezza, espressa come deviazione percentuale.

**Tabella 3.3** Precisione media (RDS) e accuratezza media (A%) per Florfenicolo e Florfenicolamina.

Concentrazione	Florfenicolo		Florfenicolamina	
	RDS	A%	RDS	A%
25 ng/mL	9,1%	-11,4%	6,6%	4,9%
250 ng/mL	9,9%	5,8%	10,4%	1,1%
2500 ng/mL	3,8%	5,3%	2,5%	-8,4%

### **LOD e LOQ**

Il LOD e il LOQ per il Florfenicolo sono rispettivamente 0,013 e 25 ng/mL. Il LOD e il LOQ per la Florfenicolammina sono rispettivamente 0,021 e 25 ng/mL.

### **3.2.3. Discussione**

Le dimensioni ridotte dei tacchini e la necessità di fare prelievi ripetuti sempre dallo stesso soggetto richiedono un metodo molto sensibile e riproducibile anche partendo da una scarsa quantità di plasma.

Partendo dai dati presenti in letteratura e dai protocolli già previsti dall'Università di Gent per l'estrazione e la quantificazione di Florfenicolo e Florfenicolammina in diverse matrici, per l'analisi dei campioni di plasma, è stato scelto un metodo che prevede l'estrazione liquido-liquido con etilacetato, la separazione in cromatografia liquida e la quantificazione con un rivelatore in spettrometria di massa (LC-MS).

Questo metodo analitico caratterizzato da una estrazione semplice e veloce, da un tempo di eluizione del Florfenicolo di 2,9 min e da un tempo complessivo della corsa di 6 min, ha permesso di analizzare un numero di campioni elevato in breve tempo. La metodica utilizzata ha superato la prova di validazione e si è dimostrata affidabile ed idonea alla conduzione dello studio di farmacocinetica nel tacchino da carne e ci ha permesso di ottenere velocemente i risultati dello studio anche in presenza di un numero elevato di animali e di campioni.

### **3.3. Studio sperimentale *in vitro* e *in vivo* in animali sani**

Lo scopo di questa parte dello studio è stato valutare la sensibilità di *O. rhinotracheale* al Florfenicolo e studiare la cinetica ematica del Florfenicolo e di un suo derivato, la Florfenicolammina, durante la somministrazione continua in acqua di abbeverata del farmaco per 5 giorni a differenti dosaggi e in diverse condizioni ambientali.

Lo studio era costituito da tre fasi. La prima fase ha previsto la valutazione della sensibilità mediante determinazione della MIC del Florfenicolo in 39 ceppi di *O. rhinotracheale* isolati in campo e conservati presso la facoltà di Medicina

veterinaria dell'Università di Gent. La seconda fase è stata una prova di farmacocinetica condotta su tacchini da carne sani con posologia di 15 mg/kg *die* di Florfenicolo in somministrazione continua in acqua di abbeverata. Nella terza fase è stata valutata la posologia di 30 mg/kg *die* di Florfenicolo in somministrazione continua in acqua di abbeverata; questa prova è stata condotta su tre gruppi di animali sani sottoposti a diverse condizioni ambientali, in particolare sono stati valutati due fotoperiodi (20h luce 4h buio e 16 h luce 8h buio) e cibo a disposizione sempre o cibo a disposizione 1h dopo l'accensione della luce.

Gli studi farmacocinetici *in vivo* sono stati approvati dal comitato etico dell'Università di Gent (numero di approvazione EC2011/O27).

### **3.3.1. Materiali e metodi della valutazione di sensibilità *in vitro***

Valutazione *in vitro* tramite determinazione della MIC della sensibilità al Florfenicolo di 38 ceppi di *O. rhinotracheale* isolati in campo.

#### **Materiali**

Columbia agar, PBS, sangue di pecora defibrinato sono stati forniti da Becton & Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Florfenicolo (grado di purezza >99%) è stato acquistato da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

I ceppi batterici di riferimento *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sono stati acquistati da Remel (Lenexa, KS, USA)

#### **Determinazione della MIC**

Per questo studio sono stati utilizzati trentotto ceppi di *O. rhinotracheale* isolati in campo da tacchini ed altri avicoli e conservati presso l'Università di Gent facoltà di Medicina veterinaria.

In assenza di un protocollo standardizzato, la determinazione delle MIC è stata eseguita col metodo delle diluizioni in piastra seguendo il protocollo proposto da Devriese *et al.* (2001).

Sono state preparate delle piastre di Columbia agar addizionate col 5% di sangue di pecora e con concentrazioni scalari di Florfenicolo che coprivano un *range* che andava da 0,0016 mg/L a 32 mg/L.

I ceppi batterici da analizzare e i ceppi batterici di controllo *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sono stati seminati in

piastre di Columbia agar addizionato con il 5% di sangue di pecora ed incubati per 48h a 37°C in atmosfera modificata col 5% di CO<sub>2</sub>.

Sono state preparate sospensioni batteriche in PBS sterile con concentrazione pari a 0,5 McFarland misurate con un lettore fotometrico Vitek System ATB1550 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) che sono state inoculate nelle piastre addizionate con Florfenicolo precedentemente preparate. In ogni piastra sono stati inoculati 17 ceppi oggetto di studio e i 2 ceppi di controllo utilizzando un inoculatore Denley Multipoint Inoculator (Mast, London, UK) in modo da ottenere un inoculo di approssimativamente 10<sup>5</sup> unità formanti colonia (cfu) per ogni ceppo. Le piastre, una volta asciutte, sono state incubate per 48h a 37°C in atmosfera modificata col 5% di CO<sub>2</sub>. Le piastre sono state lette dopo 24h per i ceppi di controllo e dopo 48h per i ceppi di *O. rhinotracheale*. Le MIC sono state registrate come la concentrazione più bassa di Florfenicolo in grado di inibire totalmente la crescita batterica.

Ogni ceppo batterico è stato analizzato in doppio.

### **3.3.2. Risultati della valutazione di sensibilità *in vitro***

#### ***Determinazione della MIC***

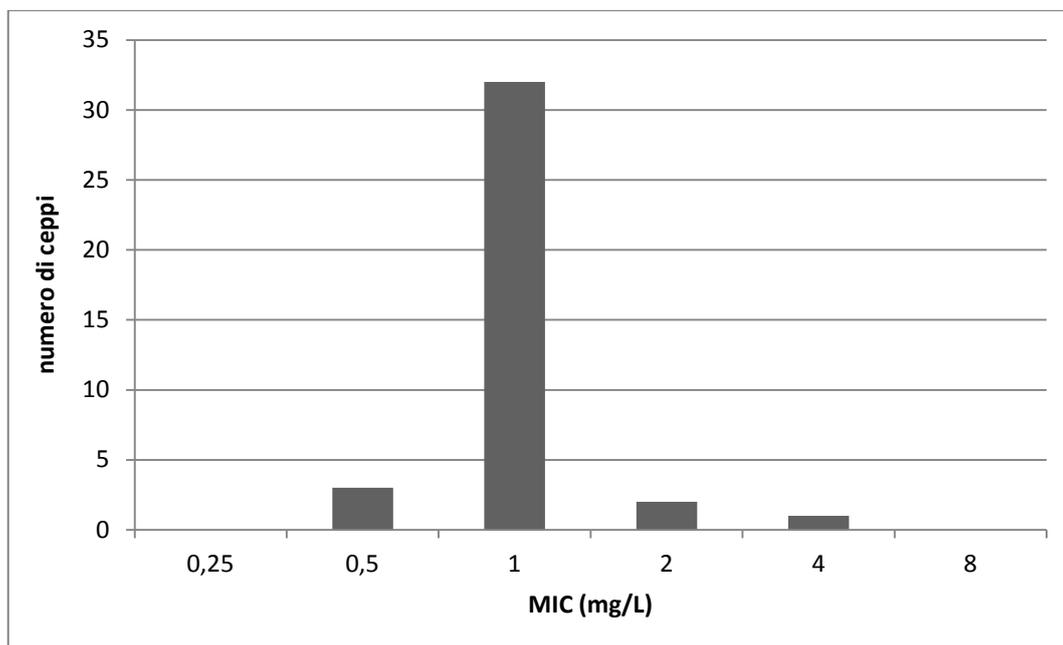
In tabella 3.4 sono riportati il numero identificativo dei 38 ceppi di campo di *O. rhinotracheale* analizzati, la specie da cui sono stati isolati e il valore di MIC del Florfenicolo, in figura 3.5. è illustrata la frequenza di distribuzione delle MIC del Florfenicolo nei confronti dei 38 ceppi batterici. Le MIC si trovano in un range che va da 0,05 mg/L a 4 mg/L; i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> sono rispettivamente di 1 mg/L e 1 mg/L. Mancando un protocollo di riferimento per il microrganismo in esame e i *breakpoint* di sensibilità, non è possibile effettuare la classificazione dei ceppi batterici in sensibili, intermedi e resistenti.

**Tabella 3.4.** della Valori di MIC ottenuti dai 38 ceppi di campo di *O. rhinotracheale*.

Ceppo	Specie	MIC (mg/L)
labo 1930	tacchino	1
labo 1931	tacchino	0,5
labo 1932	tacchino	1
labo 1933	tacchino	1
labo 1934	tacchino	0,5
labo 1935	tacchino	1
labo 1936	tacchino	1
labo 1937	tacchino	1
labo 1938	tacchino	1
labo 1939	tacchino	1
LMG 9086 16/09	tacchino	1
labo 2053	avicoli*	2
labo 2054	avicoli*	1
labo 1769	avicoli*	1
labo 1770	avicoli*	1
labo 1771	avicoli*	1
labo 1772	avicoli*	1
labo 1773	avicoli*	1
labo 1774	avicoli*	1
labo 1775	avicoli*	1
labo 1776	avicoli*	1
labo 1777	avicoli*	1
labo 1778	avicoli*	1
labo 1779	avicoli*	2
labo 1780	avicoli*	1
labo 1781	avicoli*	1
labo 1782	avicoli*	1
labo 1783	avicoli*	4
labo 1784	avicoli*	1
labo 1785	avicoli*	1
labo 1786	avicoli*	1
labo 1787	avicoli*	1
labo 1788	avicoli*	1
labo 1789	avicoli*	1
labo 1790	avicoli*	0,5
labo 1791	avicoli*	1
labo 1792	avicoli*	1
labo 1793	avicoli*	1

\*avicoli: il dato relativo alla specie non è disponibile

**Figura 3.5.** Frequenza di distribuzione delle MIC del Florfenicolo nei confronti di 38 ceppi di campo di *O. rhinotracheale*.



### **3.3.3. Materiali e metodi dello studio di farmacocinetica**

#### ***Studio di cinetica 15 mg/kg***

Otto tacchini femmine di 30 giorni, sani sulla base di un esame clinico, sono stati selezionati da un allevamento industriale di tacchini ibridi da carne. I tacchini sono stati stabulati in gruppo, in uno stabulario di 20 mq con accesso libero a acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini in accrescimento), a 27°C con umidità relativa compresa tra 60 e 70% ed un fotoperiodo di 20h luce e 4h buio.

Dopo un periodo di acclimatamento di 8 giorni, ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile. I tacchini sono stati trattati con Florfenicolo (dato riservato, preparazione commerciale in fase di registrazione) 15 mg/kg *die* per via orale in acqua di abbeverata. La somministrazione di tipo continuo è stata effettuata per 5 giorni, fornendo acqua medicata con una concentrazione di farmaco calcolata sulla base del peso dei tacchini e della quantità di acqua consumata misurata giornalmente.

La concentrazione di Florfenicolo nell'acqua è stata verificata giornalmente analizzando in LCMS le soluzioni di acqua medicata al momento della preparazione e al termine delle 24h.

Durante il primo e l'ultimo giorno di trattamento sono stati effettuati prelievi ematici per la valutazione dei parametri farmacocinetici. I prelievi sono stati fatti dalle vene tarsali prima dell'inizio del trattamento, e a 2,5h, 5h, 7,5h, 10h, 15h e 24h dall'inizio del trattamento. Il quinto giorno di trattamento sono stati effettuati prelievi anche 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h dopo il termine del trattamento.

Il sangue è stato prelevato, messo in provette contenenti EDTA, e centrifugato per separare il plasma. Il plasma è stato conservato a -80°C in attesa di essere analizzato.

### ***Studio di cinetica 30 mg/kg***

Ottanta tacchini femmine di 1 giorno sono stati acquistati presso un incubatoio industriale di tacchini ibridi da carne (Moorgut Kartzfehn von Kameke GmbH & Co. KG, Bösel, Germany) e stabulati in un unico gruppo in uno stabulario di 30 mq con accesso libero ad acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini primo periodo).

Dopo 20 giorni, 21 tacchini sono stati scelti casualmente all'interno del gruppo e sono stati suddivisi casualmente in tre gruppi da 7 animali denominati B, C e D. Ogni gruppo è stato stabulato in uno stabulario da 20 mq mantenuto a 28°C con umidità relativa compresa tra 60 e 70%. Il gruppo B era sottoposto ad un fotoperiodo di 20h di luce e 4h di buio e riceveva cibo *ad libitum* durante tutta la giornata. Il gruppo C era sottoposto ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e riceveva cibo *ad libitum* durante tutta la giornata. Il gruppo D era sottoposto ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e riceveva cibo *ad libitum* a partire da un'ora dopo l'accensione della luce.

Dopo un periodo di acclimatamento di 8 giorni, ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile, tutti e tre i gruppi sono stati trattati con Florfenicolo (dato riservato, preparazione commerciale in fase di registrazione) 30 mg/kg *die* per via orale in acqua di abbeverata. La somministrazione di tipo continuo è stata effettuata per 5 giorni, fornendo acqua medicata con una concentrazione di farmaco calcolata sulla base del peso dei tacchini e della quantità di acqua consumata misurata giornalmente.

La concentrazione di Florfenicolo nell'acqua è stata verificata giornalmente analizzando in LC-MS le soluzioni di acqua medicata al momento della preparazione e al termine delle 24h.

Durante il primo e l'ultimo giorno di trattamento sono stati effettuati prelievi ematici per la valutazione dei parametri farmacocinetici. I prelievi sono stati fatti dalle vene tarsali prima dell'inizio del trattamento, e a 2,5h, 5h, 7,5h, 10h, 15h e 24h dall'inizio del trattamento. Durante il quinto giorno sono stati effettuati prelievi anche 1h, 2h e 4h dopo il termine del trattamento.

Il sangue è stato prelevato, messo in provette contenenti EDTA e centrifugato per separare il plasma. Il plasma è stato conservato a -80°C in attesa delle analisi.

### ***Analisi dei campioni di plasma***

Le analisi dei campioni di plasma prelevati per la quantificazione di Florfenicolo e Florfenicolamina sono state effettuate come descritto al paragrafo 3.2.

### ***Analisi farmacocinetica e analisi statistica***

L'analisi farmacocinetica delle curve concentrazione-tempo è stata fatta utilizzando un software commerciale dedicato (Phoenix WinNonLin 6.1, Pharsight Corporation). I parametri farmacocinetici utilizzati sono stati l'area sotto la curva da 0 a 24h ( $AUC_{0-24}$ ), ottenuta utilizzando il metodo dei trapezi, e il picco di concentrazione ( $C_{max}$ ), ricavato dall'osservazione dei dati sperimentali per ciascun animale.

La normalità della distribuzione dei parametri ottenuti dallo studio farmacocinetico è stata verificata utilizzando il Kolmogorov-Smirnov test. Per valutare la significatività della differenza dei parametri farmacocinetici nei tre gruppi è stato utilizzato un test ANOVA a una via. La significatività statistica è stata assegnata in presenza di un valore di  $P < 0,05$ . Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con un software statistico (GraphPad Prism version 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

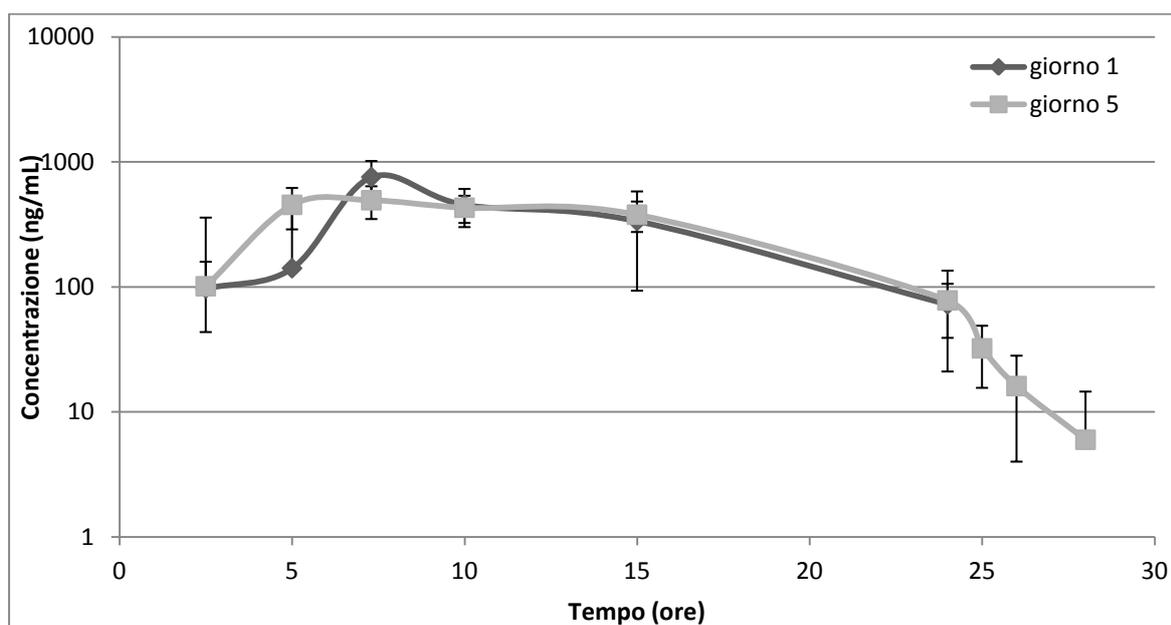
### 3.3.4. Risultati dello studio di farmacocinetica

#### **Studio di farmacocinetica a 15 mg/kg**

Il peso medio degli animali all'inizio della prova era  $1,45 \text{ kg} \pm 0,19 \text{ kg}$ . L'assunzione giornaliera di acqua è rimasta costante prima e durante il trattamento, nel *range* di 325 - 350 mL/die. Quindi la concentrazione di Florfenicolo nell'acqua di abbeverata ai fini di ottenere una dose di 15 mg/kg è oscillata tra i 62,84 e i 71,87 mg/L, sulla base dell'abbeverata del giorno precedente. Le analisi dell'acqua di abbeverata hanno confermato le concentrazioni previste per l'acqua appena preparata, dopo 24h c'era in media un incremento dell'1-2% di Florfenicolo nell'acqua. La dose di Florfenicolo somministrata agli animali nei 5 giorni è rimasta compresa tra 15,2 e 16,2 mg/kg.

Le curve di concentrazione tempo dipendenti della concentrazione di Florfenicolo nel plasma del primo e del quinto giorno di trattamento sono riportate in figura 3.6, mentre i parametri farmacocinetici  $C_{\max}$  e AUC sono riportati in tabella 3.5. Dall'analisi statistica non sono emerse differenze significative tra i dati relativi al primo giorno di trattamento e quelli relativi al quinto.

**Figura 3.6** Concentrazione plasmatica media del Florfenicolo al primo e quinto giorno di trattamento dopo somministrazione a 15 mg/kg.



**Tabella 3.5** C<sub>max</sub> e AUC<sub>0-24</sub> del Florfenicolo al primo e quinto giorno di trattamento a 15 mg/kg.

	Giorno 1 (media ± DS)	Giorno 5 (media ± DS)
C <sub>max</sub> (ng/mL)	818,03 ± 214,13	573,46 ± 132,00
AUC <sub>0-24</sub> (h·ng/mL)	6778,23 ± 2275,67	7097,95 ± 1163,15

### **Studio di cinetica 30 mg/kg**

Il peso medio degli animali all'inizio della prova era così distribuito: gruppo B 0,609 ± 0,047 kg, gruppo C 0,57 ± 0,038 kg e gruppo D 0,588 ± 0,024 kg. L'abbeverata media, la concentrazione di Florfenicolo nell'acqua di abbeverata e la dose effettivamente somministrata sono illustrate in tabella 3.6. Il quinto giorno di somministrazione il gruppo D ha bevuto meno per un cambiamento delle condizioni ambientali dovuto a un malfunzionamento del sistema di condizionamento dello stabulario ed è stato indicato a parte in tabella 3.6. Le analisi dell'acqua di abbeverata hanno confermato le concentrazioni previste per l'acqua appena preparata, dopo 24h c'era in media un incremento dell'1-2% di Florfenicolo nell'acqua.

**Tabella 3.6** Valori medi di abbeverata, concentrazione di Florfenicolo nell'acqua e dose di Florfenicolo somministrata durante i giorni di somministrazione a 30 mg/kg nei gruppi B, C, e D. I valori del quinto giorno di somministrazione del gruppo D vengono riportati a parte a causa di un'anomalia nelle condizioni ambientali che ha determinato una riduzione dell'abbeverata.

Gruppo	Acqua bevuta (mL/tacchino)	Concentrazione di Florfenicolo (mg/L)	Dose ricevuta (mg/kg)
B	148,57 ± 7,82	123,29 ± 9,01	30,46 ± 1,92
C	244,29 ± 18,49	70,65 ± 57	30,8 ± 1,40
D giorni 1-4	167,19 ± 7,86	99,74 ± 8,08	29,5 ± 1,18
D giorno 5	139,76	98,54	24,43

Nelle tabelle 3.7 e 3.8 sono riportati i valori medi delle concentrazioni plasmatiche di Florfenicolo per ogni tempo di prelievo per il primo e il quinto giorno di trattamento. Nelle figure da 3.7 a 3.12 sono riportate le curve concentrazione di Florfenicolo - tempo dei tacchini trattati suddivisi per gruppo. Al giorno 1 tutti i soggetti del gruppo B presentano un calo netto nella concentrazione plasmatica di Florfenicolo tra le 7 e le 10 ore come illustrato in figura 3.7.

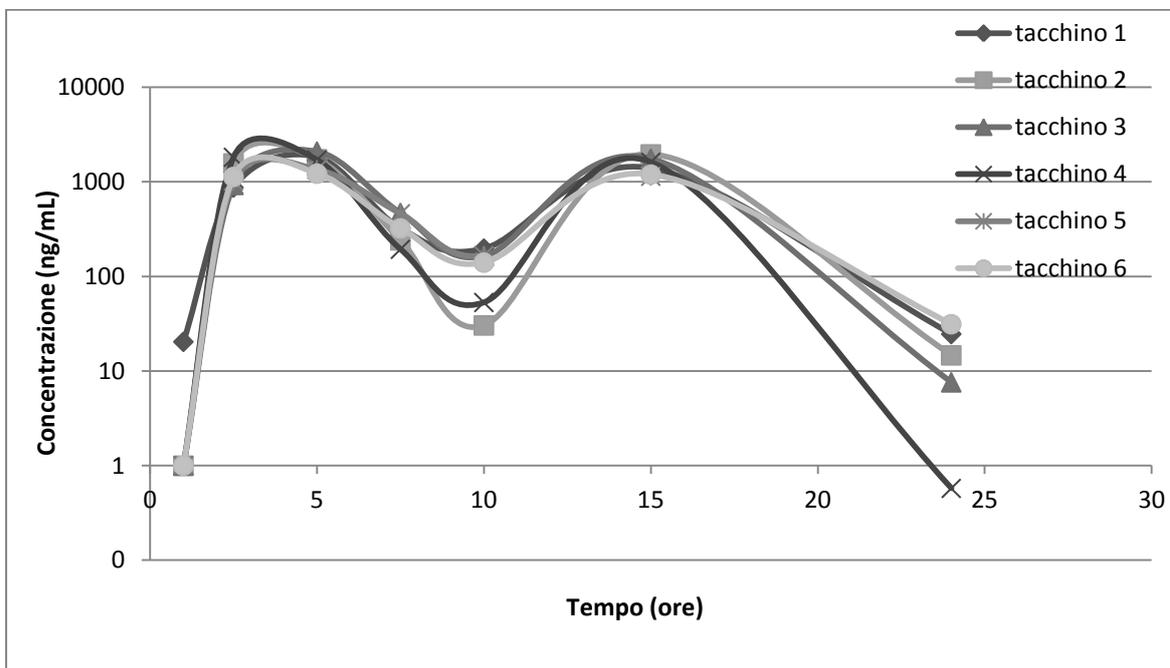
**Tabella 3.7** Concentrazione media e deviazione standard della concentrazione plasmatica di Florfenicolo per ogni tempo di prelievo del primo giorno di trattamento con 30 mg/kg nei gruppi B, C e D.

Tempo di prelievo (h)	B (media $\pm$ DS) (ng/mL)	C (media $\pm$ DS) (ng/mL)	D (media $\pm$ DS) (ng/mL)
0	0	0	0
1	4 $\pm$ 7	1803 $\pm$ 1006	1274 $\pm$ 331
2,5	1226 $\pm$ 385	1147 $\pm$ 656	1589 $\pm$ 265
5	1661 $\pm$ 322	1365 $\pm$ 720	1045 $\pm$ 237
7,5	336 $\pm$ 112	988 $\pm$ 507	1364 $\pm$ 259
10	125 $\pm$ 68	1072 $\pm$ 563	1249 $\pm$ 250
15	1515 $\pm$ 321	1168 $\pm$ 546	894 $\pm$ 115
24	13 $\pm$ 12	55 $\pm$ 43	51 $\pm$ 47

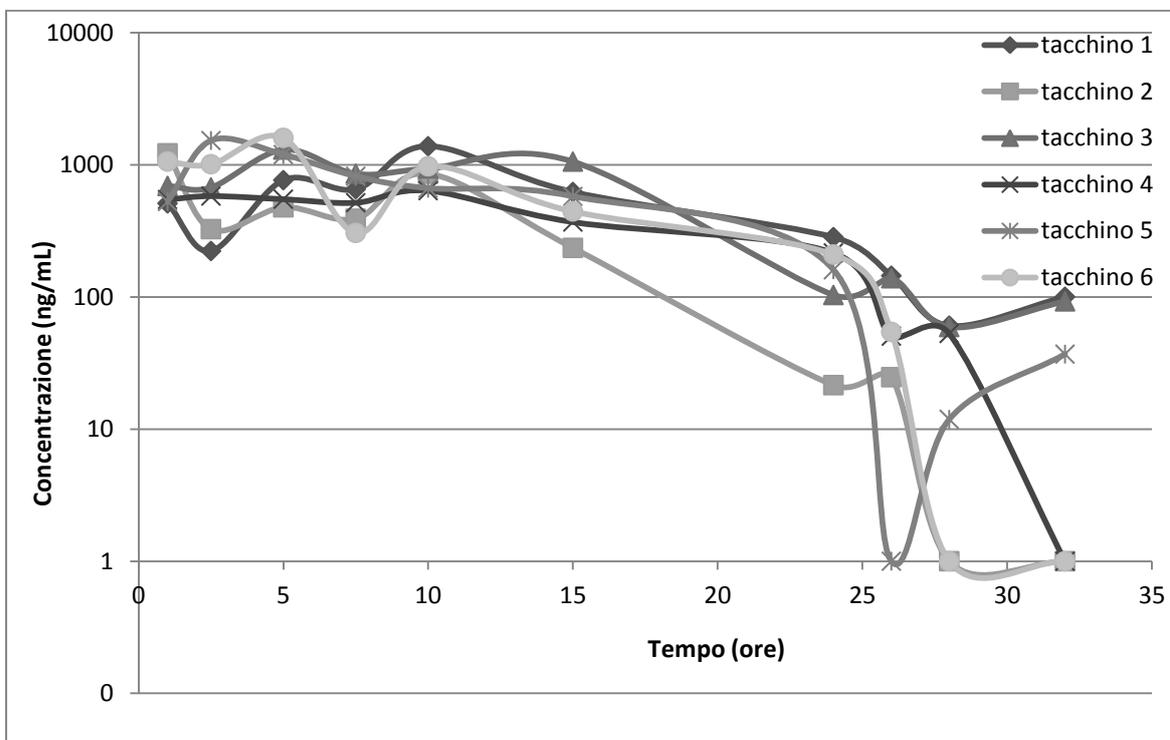
**Tabella 3.8** Concentrazione media e deviazione standard della concentrazione plasmatica di Florfenicolo per ogni tempo di prelievo del quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg nei gruppi B, C e D.

Tempo di prelievo (h)	B (media $\pm$ DS) (ng/mL)	C (media $\pm$ DS) (ng/mL)	D (media $\pm$ DS) (ng/mL)
1	760 $\pm$ 306	812 $\pm$ 551	372 $\pm$ 67
2,5	724 $\pm$ 482	1312 $\pm$ 583	911 $\pm$ 207
5	982 $\pm$ 452	816 $\pm$ 409	918 $\pm$ 181
7,5	590 $\pm$ 225	897 $\pm$ 461	646 $\pm$ 297
10	909 $\pm$ 270	1041 $\pm$ 494	660 $\pm$ 127
15	551 $\pm$ 285	1521 $\pm$ 822	692 $\pm$ 219
24	165 $\pm$ 92	102 $\pm$ 76	96 $\pm$ 68

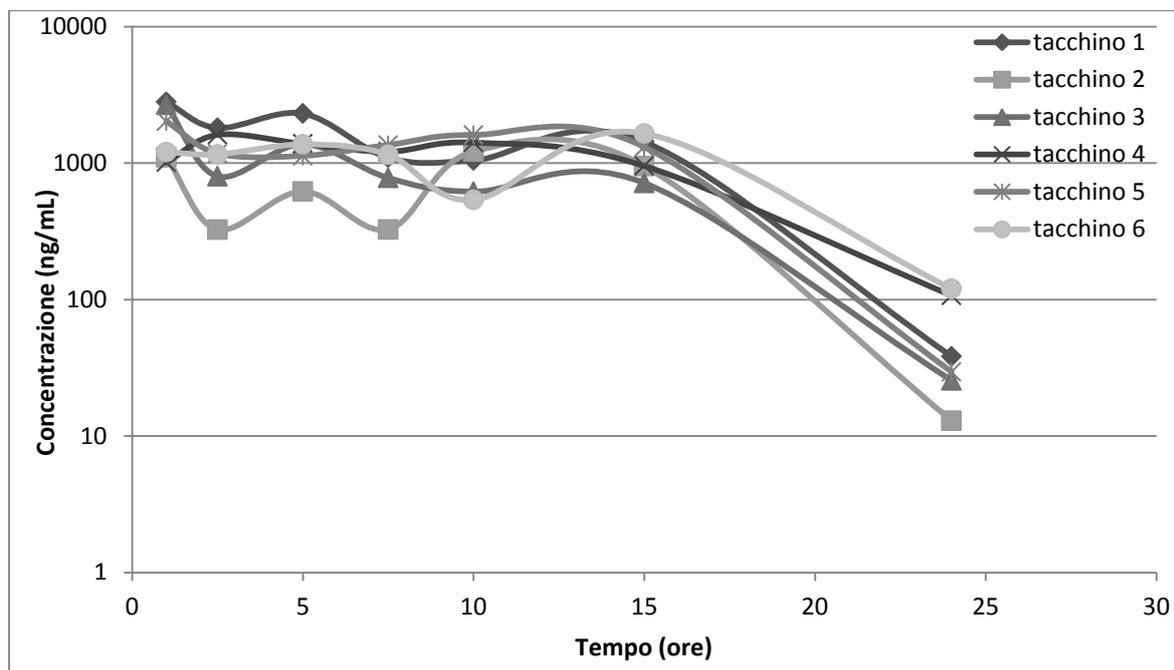
**Figura 3.7** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo B al primo giorno di trattamento con 30 mg/kg.



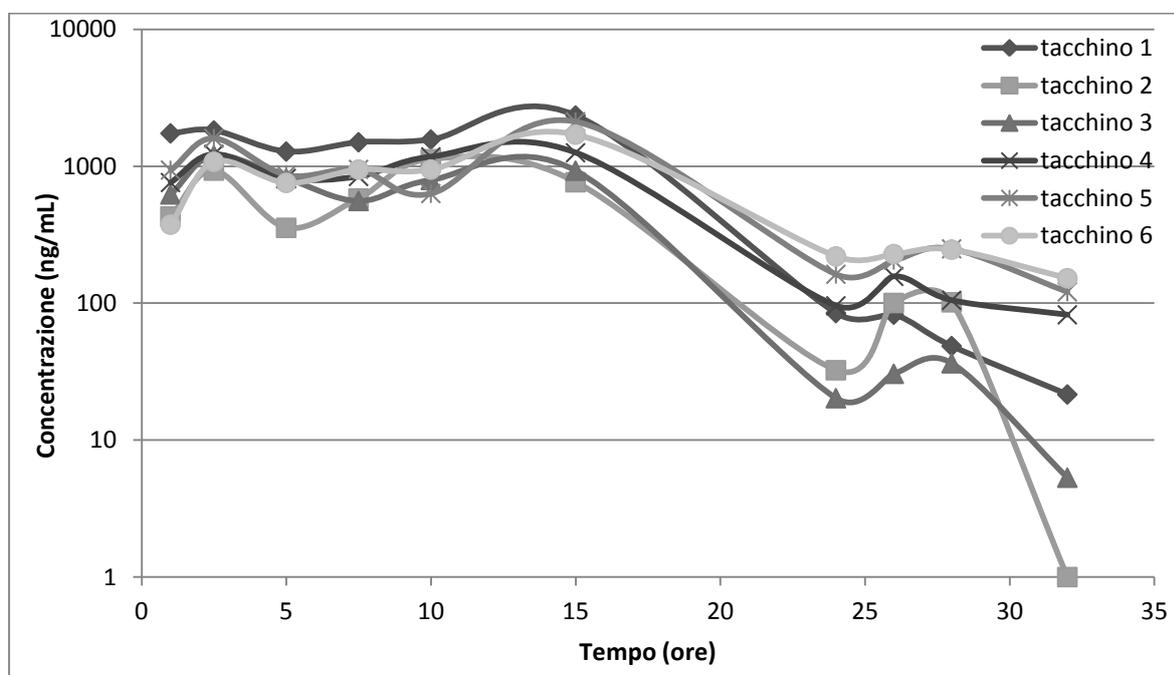
**Figura 3.8** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo B al quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg.



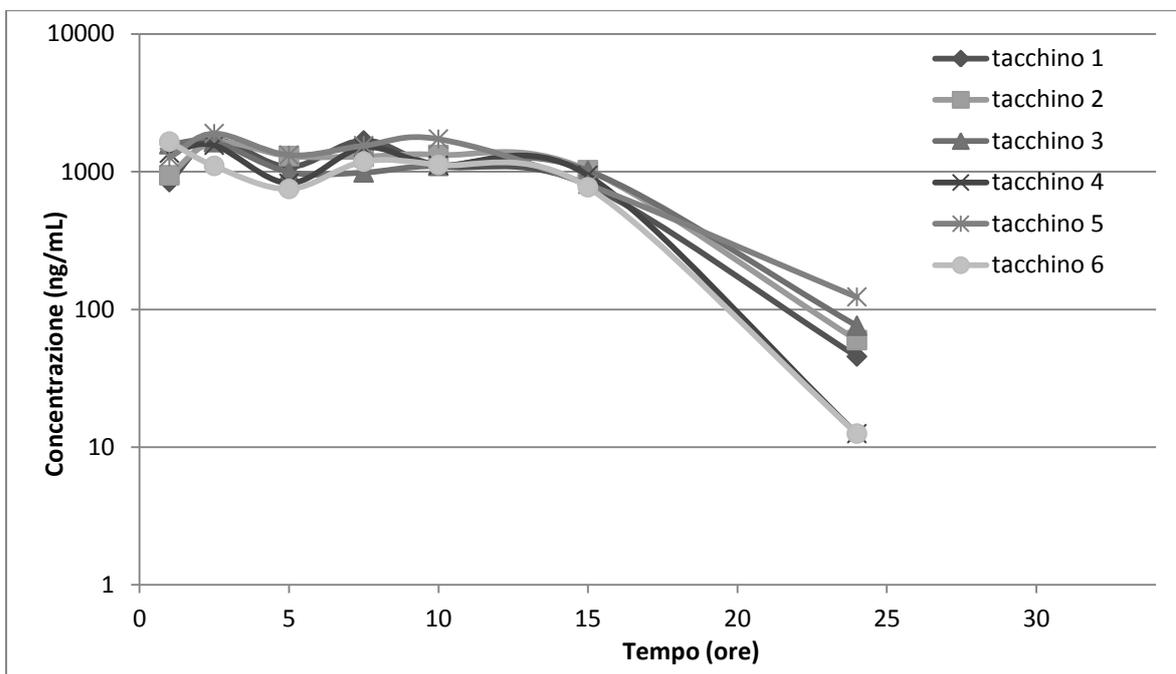
**Figura 3.9** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo C al primo giorno di trattamento con 30 mg/kg.



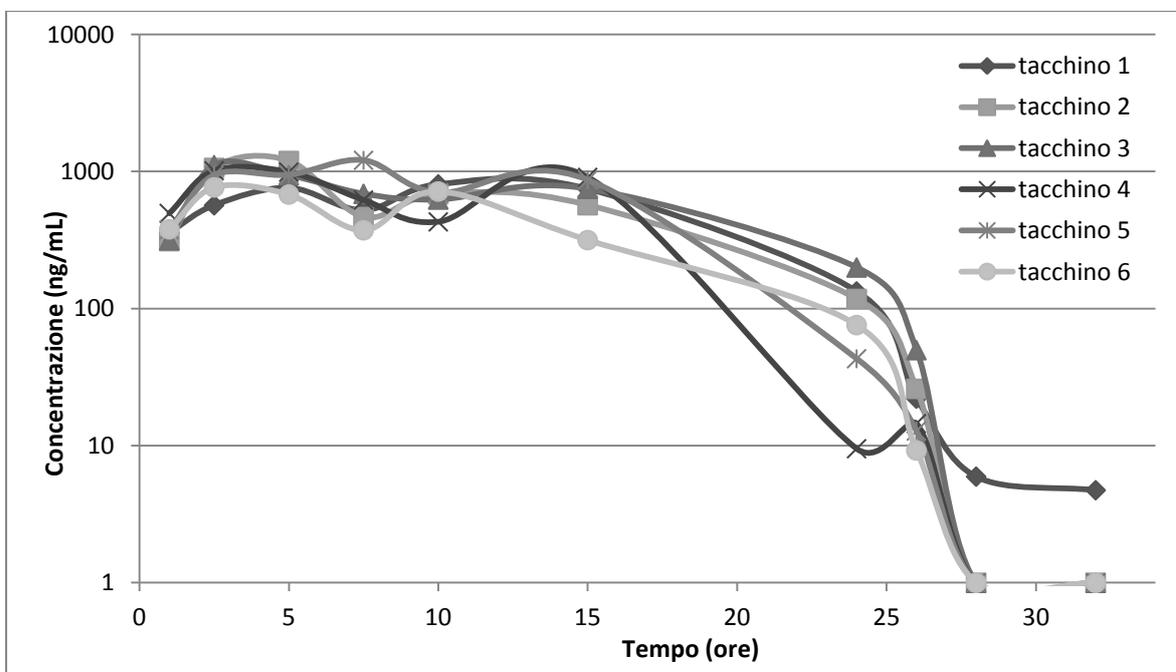
**Figura 3.10** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo C al quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg.



**Figura 3.11** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo D al primo giorno di trattamento con 30 mg/kg.

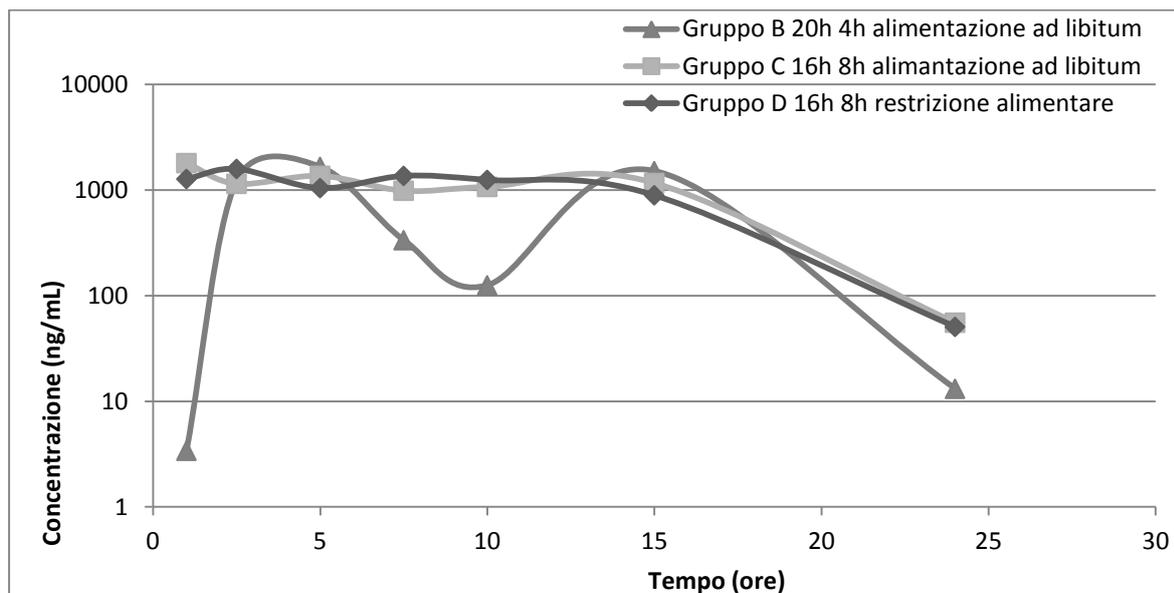


**Figura 3.12** Curve di concentrazione plasmatica del Florfenicolo nei tacchini appartenenti al gruppo D al quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg.

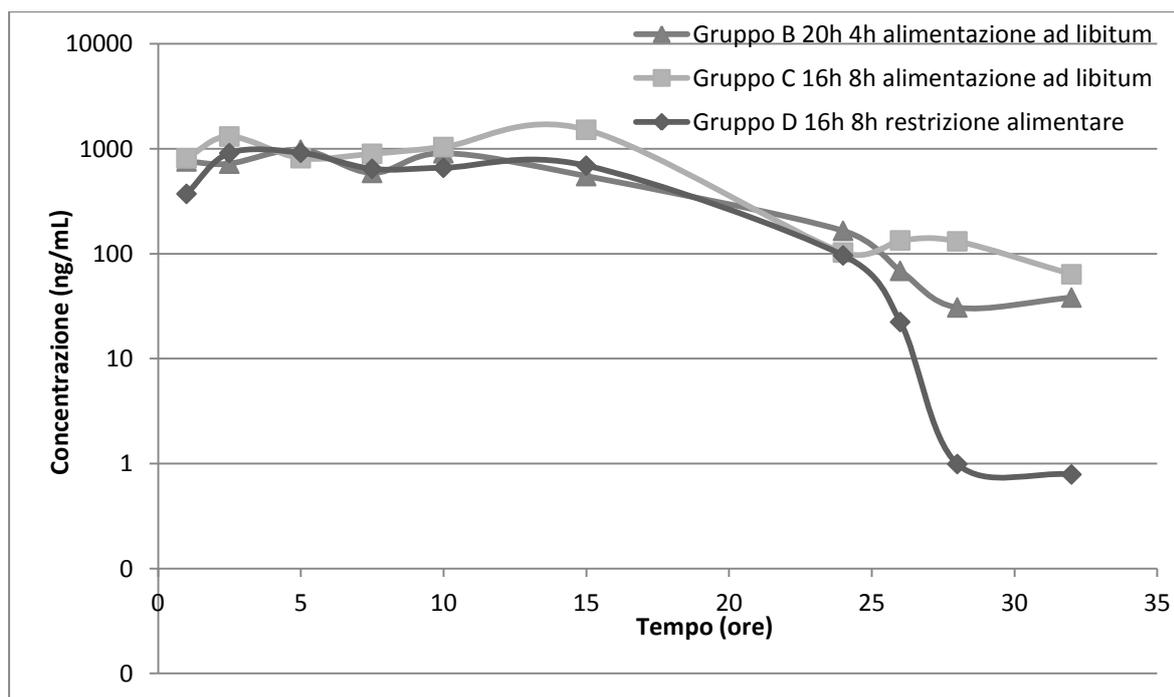


Le curve medie concentrazione-tempo del Florfenicolo nel plasma del primo e del quinto giorno di trattamento nei tre gruppi sono riportate nelle figure 3.13 e 3.14, mentre i valori medi dei parametri farmacocinetici  $C_{max}$  e AUC sono riportati in tabella 3.9.

**Figura 3.13** Curve di concentrazione plasmatica media del Florfenicolo nei tre gruppi al primo giorno di trattamento con 30 mg/kg.



**Figura 3.14** Curve di concentrazione plasmatica media del Florfenicolo nei tre gruppi al quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg.



**Tabella 3.9** C<sub>max</sub> e AUC (media ± DS) del Florfenicolo al primo e quinto giorno di trattamento con 30 mg/kg.

Giorno	Gruppo	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-24</sub> (h·ng/mL)
Giorno 1 (media ± DS)	B	1717,46 ± 34,99	18583,65 ± 2962,02
	C	1995,71 ± 631,45	22883,64 ± 5305,72
	D	1680,89 ± 114,73	21964,03 ± 2192,78
Giorno 5 (media ± DS)	B	1279,19 ± 343,96	13961,79 ± 3757,70
	C	1627,94 ± 517,44	22538,62 ± 7450,76
	D	1017,41 ± 192,28	13773,42 ± 2282,99

Dall'analisi statistica non sono emerse differenze statisticamente significative tra i parametri farmacocinetici dei tre gruppi.

### 3.3.5. Discussione

Nella prova sperimentale *in vitro* è stata valutata la MIC di 38 ceppi di campo di *O. rhinotracheale*. Il pattern di sensibilità della popolazione valutata nei confronti del Florfenicolo si presenta molto uniforme con valori che si attestano per la maggior parte attorno ad 1 mg/L. In assenza di dati di letteratura e di *breakpoint* di riferimento per la determinazione della sensibilità batterica al farmaco, non si può asserire se questo valore indichi sensibilità o resistenza. Avendo escluso che i ceppi batterici analizzati derivino tutti o in parte da un unico clone, l'estrema uniformità del dato e la corrispondenza tra MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> farebbero pensare che il valore di 1 mg/L sia da considerare il valore di MIC delle popolazioni *wild* di *O. rhinotracheale*. Per confermare questo dato sarebbe però necessario un campione più numeroso di quello fino ad ora raccolto.

Le prove sperimentali *in vivo* di farmacocinetica si sono rivelate necessarie per la presenza di dati contrastanti in letteratura sui principali parametri farmacocinetici del florfenicolo somministrato per via orale (Baert & De Backer 2006; Fraatz *et al.*, 2006).

Come già visto nei capitoli precedenti, i farmaci vengono somministrati in avicoltura per via orale in acqua di abbeverata. Questa via può presentare problemi legati all'elevato numero di fattori che influenzano la quantità di farmaco assunta dagli animali: solubilità della formulazione, stabilità del principio attivo, scala gerarchica, dimensione del gruppo, sesso, età, peso, specie, attitudini, condizioni di allevamento e condizioni sanitarie.

Il Florfenicolo nella formulazione utilizzata per questo studio (dato riservato, preparazione commerciale in fase di registrazione) ha dimostrato una buona solubilità in acqua e la soluzione anche a 144 mg/L non presentava nelle 24h problemi di stabilità o precipitazione del principio attivo. Questo dato è stato verificato giornalmente con l'analisi delle soluzioni di acqua medicata al momento della preparazione e al termine delle 24h. Le piccole fluttuazioni riscontrate all'analisi della preparazione dopo 24h (con incrementi dell'1-2%) sono probabilmente dovute all'evaporazione dell'acqua e non hanno influito in modo sostanziale sulla somministrazione del principio attivo agli animali. Durante il periodo del trattamento in nessuno dei gruppi ci sono state modifiche significative dell'assunzione di acqua da parte degli animali, anche alle concentrazioni di farmaco più elevate che sono state impiegate. Un solo calo netto di abbeverata si è verificato durante lo studio, Come si evidenzia dalla tabella 3.6 esso ha interessato il gruppo D nel quinto giorno di somministrazione ed è stato dovuto a modificazioni ambientali. Quindi si può concludere che concentrazioni di Florfenicolo fino a 144,3 mg/L non modificano la palatabilità dell'acqua tanto da determinare modificazioni significative nella quantità di acqua assunta dagli animali.

Le concentrazioni plasmatiche di Florfenicolo ottenute con la somministrazione di 15 mg/kg ai tacchini e illustrate nella figura 3.6 si sono mantenute per tutto il periodo di assunzione al di sotto del valore soglia 1 µg/mL pari al valore di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> osservate nella popolazione batterica di *O. rhinotracheale*. Quindi l'utilizzo della dose 15 mg/kg di Florfenicolo per la terapia delle infezioni sostenute da questo patogeno è inefficace. La somministrazione continua non ha evidenziato fenomeni di accumulo come è evidente dalla figura 3.6 e confermato dall'analisi statistica dei parametri farmacocinetici.

Dall'analisi di tutte le curve concentrazione-tempo, sia alla dose 15 mg/kg che alla dose 30 mg/kg, risulta evidente che la velocità di eliminazione del Florfenicolo è piuttosto alta, come confermato dal valore di emivita plasmatica riportato pari a circa 1h da Baert e De Backer (2006). Il calo delle concentrazioni di farmaco durante le ore di buio non permette il raggiungimento di uno stato stazionario nonostante la somministrazione sia di tipo continuo.

Baert e De Backer nel 2006 avevano inoltre dimostrato come la presenza di cibo nel tratto digerente modificasse in maniera sostanziale la cinetica del Florfenicolo somministrato in bolo orale alla dose 30 mg/kg, con effetti prevalenti sull'entità del picco plasmatico che a digiuno era di 14,40 µg/mL mentre dopo il pasto scendeva a 4,71 µg/mL.

In uno studio di Santos *et al.* del 1997 veniva riportata l'influenza del fotoperiodo sulla cinetica ematica dei farmaci, soprattutto per quelli con emivita breve, i parametri AUC e  $C_{max}$  erano quelli maggiormente influenzati; l'autore confermava che anche con la somministrazione continua non era possibile raggiungere lo stato stazionario.

Per i motivi soprariportati la valutazione della dose 30 mg/kg *die* è stata effettuata su tre gruppi di tacchini in differenti condizioni ambientali, in particolare sono stati utilizzati due fotoperiodi (16h di luce e 8h di buio o 20h di luce e 4h di buio) ed è stata valutata l'influenza del cibo quando questo viene somministrato alla prima ora di luce, quindi contemporaneamente alla somministrazione del farmaco con acqua, oppure quando la somministrazione del mangime viene postposta di 1h rispetto all'inizio della disponibilità dell'acqua.

Dall'analisi statistica dei parametri farmacocinetici non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi in trattamento. La presenza o assenza di cibo all'inizio del trattamento non ha condizionato la cinetica ematica del Florfenicolo. Per quanto riguarda l'influenza del fotoperiodo, analizzando le curve della concentrazione plasmatica, si evidenzia che il gruppo B (20h di luce e 4h di buio) presenta nel primo giorno una riduzione della concentrazione plasmatica molto marcata in tutti gli animali in corrispondenza dei prelievi a 7 e 10 ore, ossia durante il periodo di luce; il quinto giorno le riduzioni erano ancora più marcate rispetto a quelle degli altri due gruppi. Questo sembrerebbe indicare un'assunzione di acqua anomala nei tacchini sottoposti al fotoperiodo di 20h di luce e 4h di buio. Diversi autori (Gous & Morris, 2001; Prescott & Wates, 2002; Lewis *et al.*, 2009) hanno riportato anomalie nel comportamento dei polli sottoposti a fotoperiodi estremi quale quello usato per il gruppo B, e l'attuale normativa Europea, a tutela del benessere animale, vieta l'utilizzo nei broiler di fotoperiodi con un numero di ore di buio inferiore a 6 (Direttiva 2007/43/CE del Consiglio). Non ci sono dati

in letteratura relativi alle modifiche comportamentali dei tacchini in funzione del fotoperiodo, ma il manuale tecnico Aviagen per la gestione dei tacchini ibridi da carne sconsiglia l'utilizzo di fotoperiodi con un numero di ore di luce inferiore a 8-10 (Aviagen, 2007).

L'esame dei grafici delle concentrazioni plasmatiche di Florfenicolo di tutti i gruppi trattati con la dose di 30 mg/kg si attestano intorno al valore di 1 mg/mL che rappresenta la MIC<sub>50</sub> e la MIC<sub>90</sub> della popolazione batterica di *O. rhinotracheale* analizzata.

Il Florfenicolo appartiene alla categoria dei batteriostatici. Nei modelli PK/PD per i batteriostatici, che hanno azione prevalentemente tempo dipendente, è riconosciuto quale parametro determinante per la valutazione di efficacia il T>MIC (Lees *et al.*, 2006).

Nel nostro caso il T>MIC varia nel range 10-15 ore per la maggior parte dei tacchini appartenenti ai gruppi C e D, ma l'oscillazione attorno al valore di MIC è molto ristretta. In assenza di dati di letteratura relativi sia al farmaco che al patogeno che permettano la valutazione del modello PK/PD con *breakpoint* affidabili, la valutazione dell'efficacia del farmaco *in vitro* necessita di una prova di efficacia clinica *in vivo*.

### **3.4. Studio di efficacia clinica *in vivo***

Lo scopo del secondo studio *in vivo* è stato la valutazione dell'efficacia di una terapia a base di Florfenicolo per il controllo di infezioni da *O. rhinotracheale* nel tacchino da carne.

Lo studio è stato condotto su 56 tacchini utilizzando il Florfenicolo alla dose 30 mg/kg. Anche in questo studio è stata valutata l'influenza delle differenti condizioni ambientali, e in particolare del fotoperiodo e dello schema di alimentazione.

A questo scopo quattro gruppi di 14 animali ciascuno sono stati infettati sperimentalmente con *Metapneumovirus* aviare ed *O. rhinotracheale*, questo perché è noto che l'infezione da *O. rhinotracheale* da sintomatologia solo quando è presente un fattore favorente come una precedente infezione virale. Uno dei gruppi di 14 tacchini infetti è stato utilizzato come controllo positivo e non trattato, gli altri tre sono stati trattati tutti per via orale con Florfenicolo alla dose di 30 mg/kg con somministrazione continua in acqua di abbeverata. I

tre gruppi sono stati sottoposti alle diverse condizioni ambientali valutate durante lo studio di farmacocinetica.

Gli studi clinici in vivo sono stati approvati dal comitato etico dell'Università di Gent (numero di approvazione EC2011/O19).

### **3.4.1. Materiali e metodi**

Lo studio è stato condotto sotto la guida dei prof. Pasmans e Martel (UGent faculteit Diergeneeskunde Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten). Le tempistiche dell'infezione sperimentale e delle analisi batteriologiche sono state stabilite sulla base dei risultati e delle indicazioni di studi di efficacia clinica analoghi precedentemente condotti nella Facoltà di Medicina veterinaria dell'Università di Gent (Marien *et al.*, 2006; Marien *et al.*, 2007; Garmyn *et al.*, 2009a; Garmyn *et al.*, 2009b; ).

#### ***Infezione sperimentale***

Ottanta tacchini femmine di 1 giorno sono stati acquistati presso un incubatoio industriale di tacchini ibridi da carne (Moorgut Kartzfehn von Kameke GmbH & Co. KG, Bösel, Germany). I tacchini sono stati stabulati in gruppo, in uno stabulario di 30 mq con accesso libero a acqua e cibo (pellet commerciale per tacchini primo periodo).

Dopo un periodo di 14 giorni 56 tacchini sono stati scelti casualmente all'interno del gruppo e sono stati suddivisi casualmente in quattro gruppi da 14 animali ciascuno denominati A, B, C e D. Ogni gruppo è stato stabulato in uno stabulario da 18 mq dotato di filtri biologici, mantenuto a 28°C con umidità relativa compresa tra 60 e 70%.

I quattro gruppi, denominati A, B, C e D, sono stati sottoposti a condizioni ambientali diverse. Il gruppo A era sottoposto ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e riceveva cibo *ad libitum* durante tutta la giornata. Il gruppo B era sottoposto ad un fotoperiodo di 20h di luce e 4h di buio e riceveva cibo *ad libitum* durante tutta la giornata. Il gruppo C era sottoposto ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e riceveva cibo *ad libitum* durante tutta la giornata. Il gruppo D era sottoposto ad un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio e riceveva cibo *ad libitum* a partire da un'ora dopo l'accensione della luce.

Dopo un periodo di acclimatamento di 7 giorni ogni tacchino è stato pesato e marchiato in modo da essere identificabile. Sono stati effettuati prelievi di

sangue a tutti gli animali e il plasma è stato analizzato con un kit ELISA commerciale (BioChek, Reeuwijk, Holland) per verificare l'assenza di anticorpi verso *Metapneumovirus* aviare e *O. rhinotracheale*; lo stesso giorno è stato effettuato un tampone tracheale, seminato poi in Columbia agar addizionato col 5% di sangue di pecora, per escludere la presenza di batteri, in particolare di *O. rhinotracheale*, a livello tracheale.

Dopo 2 giorni i tacchini sono stati infettati per via oculonasale con  $10^5$  CD<sub>50</sub> di *Metapneumovirus* aviare ceppo A/T6/96 (sottotipo A) fornito dal prof. Nauwynck (UGent faculteit Diergeneeskunde Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie). Il giorno dopo i tacchini sono stati infettati per via oculonasale con  $10^{8,5}$  cfu di *O. rhinotracheale* ceppo LMG 9086 16/09 (MIC pari a 1mg/L).

A partire dal giorno successivo i gruppi B, C e D sono stati trattati con Florfenicolo (dato riservato, preparazione commerciale in fase di registrazione) 30 mg/kg *die* per via orale in acqua di abbeverata. La somministrazione di tipo continuo è stata effettuata per 5 giorni, fornendo acqua medicata con una concentrazione di farmaco calcolata sulla base del peso dei tacchini e dell'abbeverata che veniva misurata giornalmente. La concentrazione di Florfenicolo nell'acqua è stata verificata giornalmente analizzando in LC-MS le soluzioni di acqua medicata al momento della preparazione e al termine delle 24h. Il gruppo A non è stato trattato.

Dal giorno dell'infezione virale (giorno -1) al termine della prova (giorno 14) gli animali sono stati sottoposti giornalmente a visita clinica ed è stato assegnato loro un punteggio da 0 a 6 secondo il risultato della valutazione clinica che si è basata sulla seguente scala (ripresa e modificata da Van de Zande *et al.*, 2001):

- 0 tacchino sano
- 1 tacchino con scolo nasale limpido
- 2 tacchino con scolo nasale torbido
- 3 scolo nasale con seni infraorbitali moderatamente gonfi
- 4 scolo nasale con seni infraorbitali estremamente gonfi
- 5 scolo nasale con seni infraorbitali estremamente gonfi ed essudato schiumoso oculare
- 6 morte

Nei giorni 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 14 post infezione batterica su ogni animale è stato effettuato un tampone tracheale per l'isolamento e la titolazione di *O. rhinotracheale*.

Gli animali sono stati pesati il giorno prima dell'infezione batterica, 6 giorni dopo e 14 giorni dopo.

Il sesto giorno post infezione batterica 6 animali per gruppo sono stati sacrificati mediante eutanasia con T61 (Intervet, Brussel, Belgium) e sono stati sottoposti ad una necropsia in sterilità. La necropsia è stata effettuata per rilevare eventuali lesioni macroscopiche. Durante la necropsia è stato effettuato un tampone dai sacchi aerei per l'isolamento di *O. rhinotracheale* e sono stati prelevati campioni di turbinati, trachea e polmoni per l'isolamento e la titolazione di *O. rhinotracheale*.

Il quattordicesimo giorno post infezione batterica sono stati sacrificati 6 animali per gruppo mediante eutanasia con T61 (Intervet, Brussel, Belgium) ed è stata effettuata una necropsia in sterilità. Durante la necropsia sono state rilevate eventuali lesioni macroscopiche, sono stati effettuati tamponi dai sacchi aerei, dai turbinati, dalla trachea e dai polmoni per l'isolamento di *O. rhinotracheale*.

### **Materiali**

Columbia agar, PBS, sangue di pecora defibrinato sono stati forniti da Becton & Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Florfenicolo (grado di purezza >99%) è stato acquistato da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Gentamicina e Polimixina B sono state acquistate da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

### **Titolazioni batteriche**

Tutto il materiale prelevato per le analisi batteriologiche è stato analizzato subito dopo il prelievo. I tamponi e i tessuti prelevati per la titolazione batterica sono stati sospesi in PBS in modo da ottenere una diluizione 1:10, sono state preparate diluizioni seriali in base 10 in PBS. Le sospensioni batteriche sono state seminate in Columbia agar arricchito con il 5% di sangue di pecora, con 5 µg/mL di Gentamicina e con 5 µg/mL di Polimixina B e incubate a 37°C in atmosfera modificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le piastre sono state lette dopo 24h e dopo 48h, alla lettura delle 48h è stata effettuata anche

la conta delle cfu dalla piastra più idonea. I tamponi per l'isolamento batterico sono stati seminati direttamente in Columbia agar arricchito con il 5% di sangue di pecora, con 5 µg/mL di Gentamicina e con 5 µg/mL di Polimixina B, incubate a 37°C in atmosfera modificata con il 5% di CO<sub>2</sub> e lette a 24 e 48h.

### **Analisi statistica**

Tutti i parametri considerati per l'analisi statistica avevano distribuzione normale. Per il confronto statistico tra gruppi sono stati utilizzati l'ANOVA a una via e il test di Bonferroni per il confronto a coppie. La significatività statistica è stata assegnata in presenza di un valore di  $P < 0,05$ . Queste analisi statistiche sono state effettuate utilizzando un software statistico commerciale (GraphPad Prism version 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### **3.4.2. Risultati**

Due giorni prima dell'infezione i tacchini non presentavano anticorpi né verso *Metapneumovirus* aviare né verso *O. rhinotracheale* e i tamponi tracheali erano tutti negativi all'esame batteriologico.

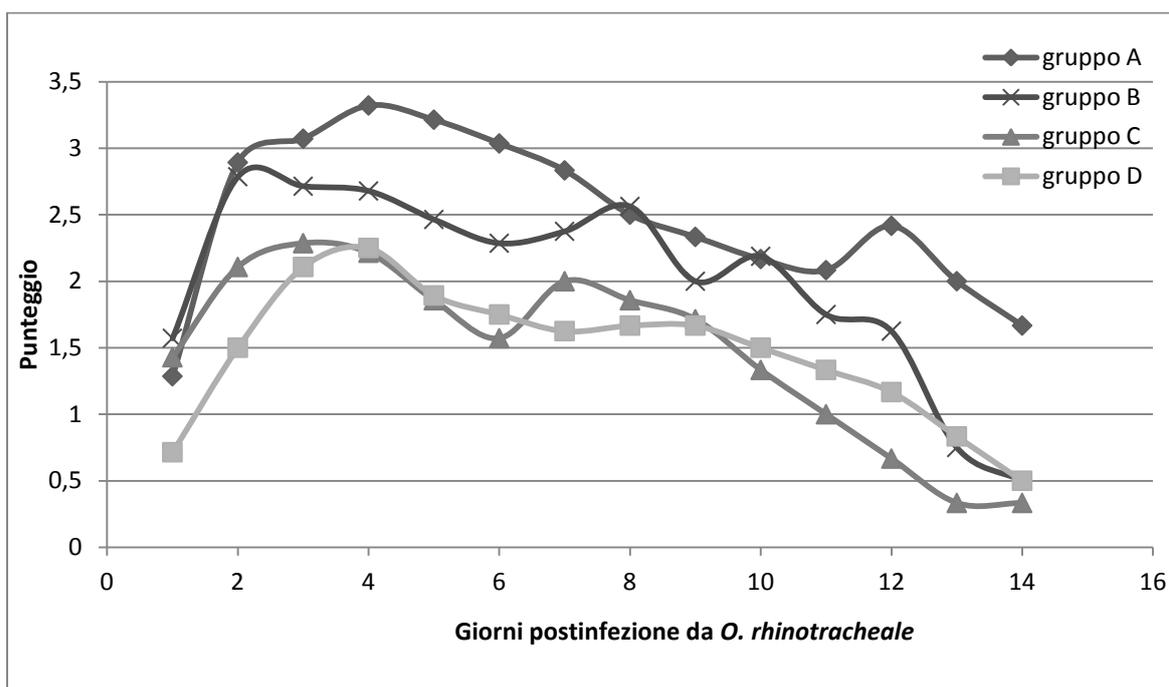
Nella tabella 3.10 sono riportati i pesi medi dei diversi gruppi prima dell'infezione batterica, dopo 6 giorni e dopo 14 giorni. Nel peso dei tre gruppi non sono state riscontrate differenze statisticamente significative.

**Tabella 3.10** Pesi medi dei tacchini prima dell'infezione batterica, dopo 6 e dopo 14 giorni.

Gruppo	Peso (media ± DS) in g		
	Prima dell'infezione	6 giorni post infezione	14 giorni post infezione
A	442,14 ± 69,54	702,08 ± 102,77	1146,00 ± 171,11
B	433,21 ± 60,28	763,36 ± 101,59	1095,50 ± 142,03
C	450,71 ± 50,38	779,93 ± 112,90	1205,67 ± 149,83
D	429,29 ± 59,96	775,57 ± 104,89	1240 ± 147,51

Le curve del punteggio clinico medio assegnato giornalmente ai tacchini dei diversi gruppi secondo la scala riportata in precedenza sono illustrate nella figura 3.15.

**Figura 3.15** Punteggio clinico medio assegnato giornalmente ai gruppi A, B, C e D.

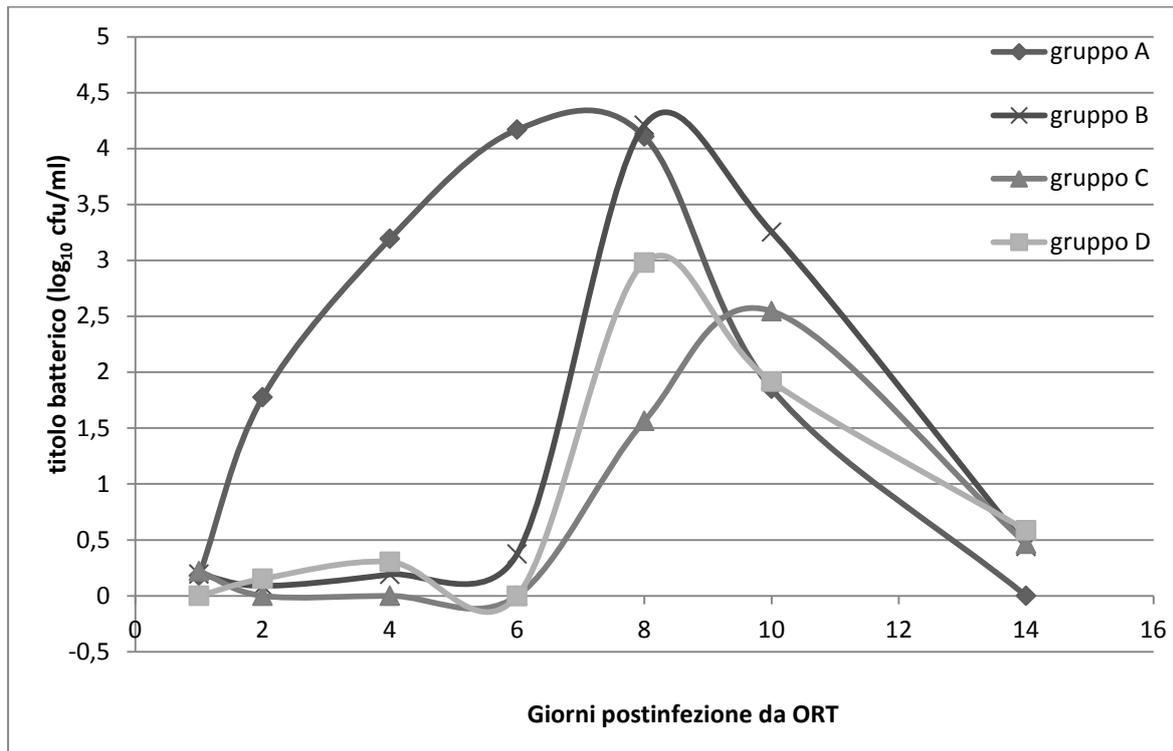


Le differenze tra i gruppi sono state valutate sia come differenze tra i punteggi medi per ogni giorno sia come differenza delle AUC dei singoli tacchini per permettere una più corretta valutazione delle variazioni tra i gruppi. Entrambi i sistemi sono stati utilizzati da altri autori (Marien *et al.*, 2006; Marien *et al.*, 2007; Garmyn *et al.*, 2009a; Garmyn *et al.*, 2009b; ) per questo tipo di valutazioni.

L'analisi statistica del punteggio medio ottenuto dai tacchini dei diversi gruppi nei primi 6 giorni, effettuata tramite test ANOVA, ha evidenziato una differenza significativa tra i quattro gruppi. Il test di Bonferroni per il confronto a coppie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) tra i gruppi A e C e tra i gruppi A e D, ma non tra i gruppi A e B. L'analisi statistica dell'area sotto la curva (AUC) per i primi 6 giorni e per tutta la durata della prova (14 giorni) ha fornito il medesimo risultato.

La curva del titolo batterico medio dei diversi gruppi in funzione del tempo è illustrata nella figura 3.16.

**Figura 3.16** Titolo batterico medio dei gruppi A, B, C e D dopo l'infezione batterica.



L'analisi statistica del punteggio medio ottenuto dai tacchini dei quattro gruppi limitatamente ai primi 6 giorni ha evidenziato tramite l'ANOVA una differenza significativa tra i gruppi ( $P < 0,05$ ). Il test di Bonferroni per il confronto a coppie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo A e tutti gli altri gruppi ( $P < 0,05$ ).

L'analisi statistica dell'area sotto la curva (AUC) limitatamente ai primi 6 giorni ha fornito il medesimo risultato, ma l'analisi di tutta la durata della prova (14 giorni) ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) solo tra le coppie di gruppi A-C e A-D, ma non per la coppia A-B.

Nelle tabelle 3.11 e 3.12 sono illustrati i risultati dell'esame necroscopico eseguito 6 giorni post infezione batterica.

**Tabella 3.11** Lesioni macroscopiche rilevate all'esame necroscopico eseguito 6 giorni post infezione nei 4 gruppi di tacchini.

Gruppo	A	B	C	D
Sinusite (numero di positivi/totale)	4/6	2/6	1/6	1/6
Tracheite (numero di positivi/totale)	0/6	0/6	0/6	0/6
Aereosacculite (numero di positivi/totale)	1/6	0/6	0/6	0/6
Polmonite (numero di positivi/totale)	1/6	0/6	0/6	0/6

**Tabella 3.12** Esito delle analisi batteriologiche effettuate sui campioni prelevati durante le necrosopie 6 giorni post infezione.

Gruppo	A	B	C	D
Trachea (log <sub>10</sub> cfu/mL)	6,01 ± 0,19	0	0	0,88 ± 1,36
Polmone (log <sub>10</sub> cfu/mL)	3,63 ± 0,69	0	0	0,65 ± 1,59
Sacchi aerei (numero di positivi/totale)	2/6	0/6	0/6	0/6

L'analisi statistica dei dati relativi alle necrosopie ha rilevato una differenza statisticamente significativa (P<0,05) tra il gruppo A e tutti gli altri gruppi.

I risultati dell'esame necroscopico eseguito 14 giorni post infezione batterica sono illustrati nelle tabelle 3.10 e 3.11.

**Tabella 3.10** Lesioni macroscopiche rilevate all'esame necroscopico eseguito 14 giorni post infezione nei 4 gruppi di tacchini.

Gruppo	A	B	C	D
Sinusite (numero di positivi/totale)	2/8	0/8	0/8	0/8
Tracheite (numero di positivi/totale)	0/8	0/8	0/8	0/8
Aereosacculite (numero di positivi/totale)	0/8	0/8	0/8	0/8
Polmonite (numero di positivi/totale)	0/8	0/8	0/8	0/8

**Tabella 3.11** Esito delle analisi batteriologiche effettuate sui campioni prelevati durante le necrosopie 14 giorni post infezione.

Gruppo	A	B	C	D
Trachea (numero di positivi/totale)	0/8	3/8	1/8	1/8
Polmone (numero di positivi/totale)	0/8	0/8	0/8	0/8
Sacchi aerei (numero di positivi/totale)	0/8	0/8	0/8	0/8

L'analisi statistica dei dati relativi alle necrosopie a giorno 14 post infezione non ha rilevato differenze statisticamente significativa tra i gruppi in esame.

### 3.4.3. Discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia terapeutica del Florfenicolo alla dose di 30 mg/kg con somministrazione continua in acqua di abbeverata per 5 giorni di trattamento nei confronti di *O. rhinotracheale*, un patogeno al momento non compreso tra le indicazioni terapeutiche dei prodotti medicinali veterinari a base di Florfenicolo autorizzati in Europa.

Il Florfenicolo è già approvato dall'EMA per l'utilizzo negli avicoli, dato che nel 2002 il CVMP ha assegnato LMR ai tessuti degli avicoli; questo ha permesso la commercializzazione di numerosi prodotti destinati alla terapia di queste

specie. Questi prodotti sono autorizzati per il trattamento di patologie enteriche e respiratorie causate da microorganismi sensibili come *Actinobacillus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, e *Streptococcus spp* (Interchemie, 2011).

I farmaci autorizzati per il trattamento delle infezioni nel tacchino da carne non comprendono *O. rhinotracheale*, ed è noto che questo patogeno presenta una resistenza elevata (van Veen *et al.*, 2001; Soriano *et al.*, 2003; Zaini *et al.*, 2008) nei confronti di numerose classi di farmaci antibatterici impiegate in avicoltura.

La scelta del Florfenicolo quale farmaco da saggiare è stata fatta sulla base del suo ampio spettro d'azione e delle sue favorevoli caratteristiche farmacocinetiche quali un buon assorbimento e un'altrettanto buona distribuzione nei tessuti che permettono il raggiungimento di siti di infezione protetti. Dall'esame dei foglietti illustrativi dei prodotti commerciali uno svantaggio per la diffusione del suo impiego sembra essere rappresentato dal tempo di sospensione di 7 giorni, relativamente lungo rispetto a quello di altri antibatterici. Questo è dovuto all'elevato accumulo del principio attivo nel fegato causa la sua lipofilia e il suo ruolo di substrato degli enzimi farmaco metabolizzanti epatici, principali responsabili della sua eliminazione.

L'infezione da *O. rhinotracheale* è piuttosto diffusa negli allevamenti di tacchini da carne e causa una sintomatologia evidente solo in presenza di fattori predisponenti che dopo aver diminuito le difese immunitarie dell'ospite ne favoriscono l'azione patogena. Per questo motivo abbiamo scelto di infettare gli animali dello studio clinico con *Metapneumovirus aviare* quale fattore predisponente, prima dell'esposizione a *O. rhinotracheale*.

Per risolvere l'infezione da *O. rinotracheale* ed evitare le perdite economiche che sono sempre conseguenti a questa patologia, anche l'utilizzo di un antibatterico ad azione batteriostatica è considerata una buona strategia, purché il farmaco sia in grado di mantenere concentrazioni efficaci a prevenire la replicazione batterica per il tutto il tempo necessario alla risoluzione dell'infezione virale in corso. In letteratura è riportato che il *Metapneumovirus aviare* nel tacchino conclude la sua fase di replicazione virale dopo 5-7 giorni dall'infezione (Van de Zande *et al.*, 1999). Quindi questo è l'intervallo di tempo che deve essere considerato per la valutazione di efficacia.

Durante lo studio di efficacia clinica la terapia a base di Florfenicolo alla dose di 30 mg/kg in somministrazione continua in acqua di abbeverata per 5 giorni ha permesso di ridurre i titoli batterici di *O. rhinotracheale* a valori inferiori a 10 cfu per 6 giorni, ossia per un tempo che può essere considerato sufficiente al superamento della fase acuta dell'infezione da *Metapneumovirus aviare*.

Per quanto riguarda l'efficacia della terapia, sulla base del confronto dei punteggi clinici dei gruppi (figura 3.15) ed in funzione dei risultati degli isolamenti si evidenzia che a partire dal sesto giorno post infezione (un giorno dopo la fine del trattamento) il patogeno *O. rhinotracheale* riprende a moltiplicarsi in tutti i tacchini di tutti i gruppi trattati, ma la risoluzione della patologia è più rapida che nel gruppo di controllo.

Il gruppo di controllo (A) infatti presenta un punteggio clinico medio molto elevato, che si mantiene per 5 giorni sopra al valore di 3 (figura 3.15), probabilmente grazie all'azione sinergica dell'infezione da *Metapneumovirus aviare* e dell'*O. rhinotracheale*. Il punteggio ottenuto dai gruppi trattati C e D (fotoperiodo con 16h di luce e 8h di buio) è più ridotto (di poco sopra al 2) e statisticamente diverso ( $P < 0,05$ ) da quello del gruppo A. Questo presumibilmente perché la terapia riesce ad evitare la crescita contemporanea dei due patogeni, e la replicazione dell'*O. rhinotracheale* successiva alla risoluzione della fase acuta dell'infezione da *Metapneumovirus aviare* non determina sintomatologia grave.

Per quanto riguarda l'andamento della sintomatologia clinica (figura 3.15) e della replicazione batterica nei gruppi B C D di tacchini dello studio (figura 3.16) va osservato che il gruppo B (sottoposto ad un fotoperiodo di 20h di luce e 4h di buio) presenta, rispetto ai gruppi C e D, sia un punteggio clinico più elevato che titoli batterici più elevati. Come confermato anche dall'analisi statistica la terapia in questo gruppo sembra essere meno efficace. Valutando i risultati cinetici dei diversi gruppi, riportati nei paragrafi precedenti, si può notare che il decremento di efficacia osservato è correlato alla concentrazione plasmatica del farmaco che nel gruppo B è molto erratica e a sua volta causata da un'assunzione incostante dell'acqua medicata. La causa principale va ricondotta all'esposizione degli animali a un fotoperiodo troppo squilibrato nel rapporto luce buio che altera il normale comportamento sonno veglia. Lo studio delle variazioni del fotoperiodo a cui sono stati esposti gli animali dei

diversi gruppi, conferma che l'efficacia di una terapia che prevede la somministrazione del farmaco in acqua medicata risente fortemente del fotoperiodo mentre il momento in cui viene somministrato il cibo durante il trattamento non influenza significativamente il risultato della terapia.

Questo studio ha rilevato una discreta efficacia del trattamento con 30 mg/kg di Florfenicolo in somministrazione continua in acqua di abbeverata per il contenimento delle infezioni da *O. rhinotracheale*, ma conferma che la dose utilizzata è insufficiente a garantire la sterilizzazione dei soggetti sottoposti a trattamento.

### **3.5. Discussione e conclusioni**

Il Florfenicolo, farmaco batteriostatico, caratterizzato da un buon assorbimento, buona distribuzione ai tessuti e da un ampio spettro d'azione è stato proposto quale opzione terapeutica a due diverse posologie per le infezioni da *O. rhinotracheale*, sulla base dei dati di farmacodinamica *in vitro* che avevano evidenziato un valore di sensibilità pari a 1 mg/L, per MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub>.

Le prime prove di cinetica hanno evidenziato una probabile assenza di efficacia clinica del Florfenicolo alla dose 15 mg/kg con somministrazione continua in acqua di abbeverata causa le ridotte concentrazioni ematiche riscontrate negli animali trattati. La somministrazione continua con acqua di abbeverata di Florfenicolo 30 mg/kg ha invece determinato nel plasma dei tacchini trattati, concentrazioni che, fluttuando intorno al valore di MIC (figure 3.13 e 3.14), potevano dimostrarsi efficaci negli studi clinici.

Nell'infezione sperimentale di tacchini da carne, questa dose è stata in grado di contenere l'infezione da *O. rhinotracheale*, con una riduzione significativa dei titoli batterici durante tutto il trattamento e una altrettanto significativa riduzione della sintomatologia e delle perdite economiche che potrebbero derivare dalla diffusione dell'infezione in allevamento.

Da un punto di vista clinico la terapia proposta è riuscita a raggiungere gli scopi prefissati, va tuttavia ricordato che l'oscillazione osservata delle concentrazioni efficaci raggiunte con la dose 30 mg si verifica in un ristretto intervallo intorno al valore di MIC e che l'applicazione della terapia alle condizioni di allevamento porta sempre a un forte aumento della variabilità

delle concentrazioni ematiche. A conferma di ciò si sottolinea che la replicazione batterica è molto evidente subito dopo la fine del trattamento. Anche questo fa presupporre che l'utilizzo su larga scala della posologia studiata possa causare un'ampia variabilità di risposta negli animali e favorire così la selezione di ceppi resistenti. In un'ottica di uso prudente degli antimicrobici e in presenza di un patogeno che presenta già livelli di resistenza piuttosto elevata nei confronti di diverse classi di antimicrobici (van Veen *et al.*, 2001; Soriano *et al.*, 2003; Zaini *et al.*, 2008) l'uso di Florfenicolo a questa posologia potrebbe rivelarsi controproducente. Riteniamo quindi necessario rivalutare la dose proposta, considerando che la modalità di somministrazione in acqua medicata non maschera odori e sapori. Un eventuale incremento della dose e quindi delle concentrazioni in acqua potrebbero influenzare negativamente la solubilità del principio attivo e alterare la palatabilità dell'acqua, non garantendo la corretta assunzione di farmaco da parte di tutti gli animali sottoposti a trattamento.

Gli studi condotti con il Florfenicolo durante lo stage presso la facoltà di Medicina veterinaria dell'Università di Gent avevano come scopo la valutazione di efficacia di una nuova formulazione del Florfenicolo ai fini dell'autorizzazione all'immissione in commercio e non hanno contemplato per il momento lo studio di deplezione residuale. Poiché le preparazioni attualmente autorizzate con la dose di 30 mg/kg prevedono un trattamento di circa 3 giorni e un tempo di sospensione di 7 giorni, è probabile che una terapia di 5 giorni possa richiedere un tempo di sospensione superiore limitando quindi l'applicabilità della terapia in campo.

Il nostro lavoro conferma inoltre i dati di Santos *et al.* del 1997 che identificavano nel fotoperiodo uno dei fattori in grado di influire sulla farmacocinetica dei farmaci somministrati per via orale in acqua di abbeverata. In particolare un fotoperiodo considerato estremo che prevede soltanto 4 ore di buio può ridurre l'efficacia della terapia antibatterica.

Alla luce di questi dati si conferma anche nel tacchino da carne l'insorgenza di alterazioni comportamentali che portano a sconsigliare fortemente l'impiego di fotoperiodi con meno di 8h luce, come indicato dai manuali tecnici delle ditte di selezione genetica (Aviagen, 2007).



## 4. Conclusioni

Nell'arco dei tre anni di dottorato è stata valutata attraverso studi *in vitro* e *in vivo* e con l'utilizzo di modelli PK/PD l'efficacia di due terapie antibatteriche per il trattamento di patologie respiratorie nel tacchino da carne, utilizzando l'acqua medicata, quale via di somministrazione dei farmaci studiati.

La corretta gestione della terapia è garantita dalla scelta adeguata del farmaco, della via di somministrazione e dalla definizione di una posologia corretta attraverso dosi e frequenza di trattamento adeguate. Da questo studio sono emersi numerosi fattori che contribuiscono a rendere difficile e non sempre efficace la gestione delle terapie antibatteriche nel tacchino da carne. I risultati hanno confermato che l'acqua medicata, la via di somministrazione più impiegata in avicoltura, pur presentando diversi benefici necessita di numerosi attenzioni per essere una via efficace.

Le linee guida sull'utilizzo prudente e mirato del farmaco indicano che la scelta dell'antibatterico deve essere fatta sulla base dei risultati dei test di screening per la valutazione della sensibilità dei ceppi isolati in campo agli antibatterici, al fine di selezionare il farmaco più adeguato alla terapia ed evitare la diffusione di fenomeni di antibiotico resistenza.

I risultati ottenuti dagli studi condotti nel 2010 hanno confermato che l'Enrofloxacin, è efficace verso un numero ormai troppo ridotto (< 30%) dei ceppi di APEC isolati da tacchini in allevamento e fanno supporre un pari grado di resistenza nei ceppi batterici attualmente circolanti negli allevamenti intensivi di tacchini da carne del Nord Italia. Le indicazioni di mercato però confermano che Enrofloxacin resta tra i principi attivi più utilizzati in avicoltura, anche in seguito alle recenti concessione di AIC a numerosi medicinali veterinari generici immessi sul mercato, in seguito alla cessazione del brevetto di proprietà di Enrofloxacin della Bayer.

Il perdurare dell'utilizzo di farmaci non più efficaci alle stesse dosi autorizzate negli anni '90, quando le valutazioni di efficacia del farmaco si basavano su valori di MIC di almeno 100 volte inferiori alle attuali, potrà determinare effetti dirompenti sulla diffusione di resistenza nei ceppi patogeni.

Tra le cause più frequenti dei fallimenti terapeutici, anche in presenza di un farmaco efficace, si possono annoverare: una conoscenza insufficiente del

farmaco scelto, gli errori della valutazione dei dosaggi e della frequenza di somministrazione e, infine, una non corretta gestione del farmaco in allevamento.

Tra le cause di errore nella definizione della dose terapeutica possono esserci anche le stesse indicazioni terapeutiche riportate nel foglietto illustrativo.

La scarsità di informazioni sulla efficacia dei farmaci nella specie tacchino nasce dal minor interesse commerciale del tacchino in Europa, considerato dal CVMP specie minore, che ha causato un minor numero di farmaci autorizzati per questa specie e la prassi, durante l'utilizzo in deroga dei farmaci veterinari, di trasferire senza alcuna modifica le posologie stabilite nel pollo al tacchino.

Nel tacchino è possibile che i processi di distribuzione e di metabolizzazione epatica, diversi da quelli del pollo, possano modificare la velocità di eliminazione del prodotto come nel caso dell'Enrofloxacin. Come riportato nello studio di Da Silva *et al.* (2006) quando il farmaco viene somministrato al pollo quale bolo orale alla dose di 10 mg/kg determina un valore di AUC pari a 35  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ , mentre la stessa posologia nel tacchino determina un valore di AUC di 18,11  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ , come riportato nello studio di Dimitrova *et al.* (2007). Fin dalle prime autorizzazioni all'immissione in commercio di medicinali a base di Enrofloxacin le indicazioni di impiego sono sempre state le stesse per le due specie animali.

Talvolta le indicazioni di posologia riportate nelle schede possono portare a una riduzione dell'efficacia e qualche volta al fallimento dei trattamenti terapeutici anche quando attentamente seguite.

Infatti un'altra causa di errore nella definizione del protocollo di trattamento in allevamento si verifica quando questo viene trasferito dalla fase sperimentale alla applicazione in campo. Gli studi sperimentali effettuati ai fini della registrazione di un medicinale veterinario prevedono studi di cinetica e di efficacia finalizzati alla definizione della dose efficace del farmaco. Pertanto la somministrazione del farmaco avviene con un bolo unico a numeri elevati di animali sani, mantenuti in condizioni controllate e spesso in gabbia metabolica. L'eccessivo controllo dei parametri ambientali da un lato rende la sperimentazione accurata e ripetibile, ma dall'altro si verifica a condizioni specifiche e ben precise e non prende in considerazione tutte le variabili che si possono verificare in campo, allontanandosi dalle condizioni reali

dell'allevamento in cui verrà effettuato il trattamento. Questa situazione è nota come è noto anche il ruolo della farmacovigilanza veterinaria che dovrebbe vigilare sul prodotto nei 5 anni successivi alla commercializzazione e all'attenzione che tutti gli utilizzatori del farmaco dovrebbero avere, per sorprendere le alterazioni di efficacia o gli effetti avversi conseguenti all'utilizzo del farmaco su numeri di animali di gran lunga superiori a quelli utilizzati prima della commercializzazione e talvolta anche in condizioni di somministrazione diverse.

Come già dimostrato da vari autori (Anadón *et al.*, 1995; Sàrközi *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2010) la via e gli intervalli di somministrazione sono determinanti per il raggiungimento e il mantenimento di concentrazioni efficaci in circolo. Knoll *et al.* (1999) hanno dimostrato che per l'Enrofloxacin e la Danofloxacin estendere i dati di efficacia ottenuti con la somministrazione in bolo orale alla somministrazione del farmaco effettuata con acqua medicata può determinare una sovrastima dell'efficacia della terapia. Questo dato è confermato anche dal confronto tra i dati ottenuti da Dimitrova *et al.* (2007) nel tacchino da carne trattato con un bolo orale di 10 mg/kg di Enrofloxacin; i parametri ottenuti con l'analisi farmacocinetica ( $C_{max}$  1228 ng/mL, AUC 16130 h·ng/mL) erano di gran lunga superiori a quelli ottenuti in questo studio a parità di dose, nella stessa specie ma con la somministrazione in acqua medicata pulsata per 10 ore al giorno ( $C_{max}$  396 ng/mL, AUC 5531 h·ng/mL).

Ai fini di ottemperare adeguatamente a quanto richiesto dalle nuove linee guida dell'EMA sull'uso prudente e mirato degli antibatterici riteniamo di fondamentale importanza il controllo delle prove efficacia non solo su numeri elevati di animali ma soprattutto adeguando il più possibile il protocollo di trattamento sperimentale a quello che effettivamente sarà utilizzato nella pratica.

Le numerose interferenze che possono influenzare le concentrazioni di farmaco in soluzione, già riportate nell'introduzione della presente tesi, sono in grado di ridurre significativamente le concentrazioni di farmaco nell'animale e non sempre sono riportate nelle avvertenze del foglietto illustrativo o della scheda tecnica.

A parità di specie e di via di somministrazione anche i parametri ambientali possono inficiare la corretta riuscita della terapia alterando la quantità di

acqua assunta e la frequenza di abbeverata degli animali. Il controllo dei parametri ambientali è sicuramente un punto molto importante per assicurare il normale ritmo di alimentazione negli animali. Una volta scelta la terapia più opportuna, valutando la sensibilità del patogeno e adottando una dose corretta, bisogna accertarsi che gli animali assumano effettivamente la dose attraverso il consumo della corretta quantità di acqua.

Anche in gruppi di animali sani tenuti in condizioni apparentemente identiche il microclima può determinare modificazioni notevoli nella quantità di acqua assunta, come risulta evidente anche dallo studio di farmacocinetica condotto con il Florfenicolo nei tacchini sani. I tre gruppi erano costituiti da tacchini tutti della stessa età, provenienti dallo stesso incubatoio, e stabulati alle stesse condizioni di temperatura e umidità relativa; nonostante ciò la quantità di acqua assunta durante gli stessi giorni variava notevolmente tra i diversi gruppi. A questa variabilità va poi aggiunta quella dovuta alla diversa gravità della patologia degli animali trattati in campo. Anche se questo dato è noto riteniamo importante sottolineare che le indicazioni di impiego dei foglietti illustrativi dovrebbero riportare solo alcuni suggerimenti sui rapporti di solubilizzazione tra le quantità di farmaco e acqua, che dovrebbe essere sempre riportata l'indicazione in mg/kg di peso e che il corretto fattore di diluizione del farmaco per ottenere la dose desiderata va stabilito solo sulla base dell'effettiva assunzione di acqua e del peso medio degli animali da trattare misurati al momento del trattamento.

Nello studio condotto sul Florfenicolo si è evidenziata una modificazione della frequenza di abbeverata con conseguente alterazione dell'andamento delle concentrazioni ematiche negli animali del gruppo B, esposti a un fotoperiodo con un numero di ore di buio molto ridotto (20h di luce e 4h di buio). L'influenza negativa del fotoperiodo durante il trattamento continuo con acqua di abbeverata, era già stata riportata da Santos *et al.* (1997), l'autore sottolineava l'importanza di queste modificazioni soprattutto per i farmaci con emivita breve, tra cui anche il Florfenicolo, che in questi casi non riescono a mantenere concentrazioni plasmatiche efficaci.

La somministrazione dei farmaci mediante acqua di abbeverata, al momento è utilizzata prevalentemente come terapia di degli massa degli avicoli per motivi di praticabilità e di economicità dettate dai numeri di animali in trattamento; le

recenti indicazioni dell'EMA suggeriscono un sempre maggior utilizzo di questa via anche in altre specie quali il suino, per il quale la maggior parte delle terapie è ancora effettuata con la somministrazione di mangime medicato. Il fenomeno di *cross contamination* da parte di antibatterici è considerato inevitabile nel processo di produzione dei mangimi medicati ma sempre più spesso viene indicato tra le cause di diffusione di resistenza agli antibatterici impiegati in veterinaria. L'utilizzo dei mangimi medicati è sempre più frequentemente ostacolato nei paesi del Europa del nord che caldegiano la sua sostituzione con l'utilizzo dell'acqua medicata.

E' auspicabile che tutte le evidenze negative del trattamento con acqua medicata fin qui riportate per gli avicoli, siano opportunamente segnalate e corrette, attraverso l'informazione di tutti gli operatori di settore, per minimizzare quanto più possibile i molti fattori che possono inficiare l'efficacia di questa via di somministrazione in altre specie.



## 5. Bibliografia

- Aarestrup F. M. , Wegener H. C. (1999). The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1: 639-44.
- AliAbadi F. S., Lees P (2003). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *Int J of Antimicrob Agents* 14: 307–313.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Díaz M., Bringas P., Martínez M. A., Fernández-Cruz M. L., Fernández M. C., Fernández R. (1995). Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res* 56: 501-506.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Iturbe J., Martínez M. A., Díaz M. J., Frejo M. T., Martínez M. (2001). Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci* 71: 101-109.
- Anonimo (2003). USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs – Antibiotics. *J vet Pharmacol Therap* 26(2): 81-108.
- Aviagen (2007). Management essential for commercial turkeys. [http://en.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Turkeys\\_commercial/ATI/mgmt\\_guides/Mgmt\\_Ess\\_Commercials.pdf](http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Turkeys_commercial/ATI/mgmt_guides/Mgmt_Ess_Commercials.pdf) (ultimo accesso 22 Gennaio 2012)
- Baert K., De Backer P. (2006). Pharmacokintics and bioavailability of oral florfenicol in fasted and fed broiler chickens. *J vet Pharmacol Therap* 29 (1): 279.
- Ball P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 46: 17-24.
- Barnes H. J., Nolan L. K., Vaillancourt J. P. (2008). Colibacillosis. In Saif Y. M., *Diseases of poultry*, twelfth edition, Blackwell Publishing Professional, Ames, pp 691-738.
- Bayer (2007). Foglietto illustrativo del Baytril 10% O. L. flacone da 1 litro.

- Brown S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *J vet Pharmacol Therap* 19: 1-14.
- Bywater R., Silley P., Simjee P. (2006). Antimicrobial breakpoints- Definitions and conflicting requirements. *Vet Microbiol* 118: 158-159.
- Cantón R., Morosini M. I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 35(5):977-91.
- Castanon J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 86: 2466-2471.
- Chin R. P., van Empel P. C. M., Hafez H. M. (2008). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In Saif Y. M., *Diseases of poultry*, twelfth edition, Blackwell Publishing Professional, Ames, pp 765-774.
- Christodoulou E., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N. (2007). Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *J Chromatogr B* 859: 246-255.
- Council recommendation of 15 November 2001 on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine (2002/77/EC). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:034:0013:0016:EN:PDF> (ultimo accesso 21 Dicembre 2011)
- Da Silva R. G., Reyes F. G. R., Sartori J. R., Rath S. (2006). Enrofloxacin assay validation and pharmacokinetics following a single oral dose in chickens. *J. vet Pharmacol Therap* 29: 365-372.
- Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE, del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati [notificata con il numero C(2002) 3044]. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:IT:PDF> (ultimo accesso 12 Dicembre 2011).
- Devriese L. A., Hommeez J., Vandamme P., Kersters K., Haesebrouck F. (1995). In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *Vet Rec.* 137(17):435-436.

- Devriese L. A., De Herdt P., Haesebrouck F. (2001). Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. *Avian Pathol* 30: 197-200.
- Dimitrova D. J., Lashev L. D., Yanev S. G., Pandova B. (2007). Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Res Vet Sci* 82: 392-397.
- Direttiva 2007/43/CE del Consiglio del 28 giugno 2007 che stabilisce norme minime per la protezione dei polli allevati per la produzione di carne <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:182:0019:0028:IT:PDF> (ultimo accesso 12 Dicembre 2011).
- Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1996L0023:20060101:it:PDF> (ultimo accesso 12 Dicembre 2011).
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EMEA (European Medicine Agency) (2009). ECDC/EMEA Joint technical report. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. *EFSA Journal* 8(4):1309 1-304.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 9(8):2322.
- EMA(European Medicines Agency) (2010). Opinion following an Article 351 referral for all veterinary medicinal products containing quinolones including fluoroquinolones intended for use in food-producing species. EMA/186029/2010.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_do](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_do)

cument/quinolones\_35/WC500094630.pdf (ultimo accesso 5 Settembre 2011).

- EMEA (European Medicines Agency) (2002). Florfenicol (Extension to all food producing species) Summary Report. EMEA/MRL/822/02-FINAL. [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014282.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014282.pdf) (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- EMEA (European Medicines Agency) (2005). Notice to applicants guideline. Veterinary medicinal products. Establishment of maximum residue limits of Veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-8/pdf/vol8\\_10-2005\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-8/pdf/vol8_10-2005_en.pdf) (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- EMEA (European Medicines Agency) (2006). Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the european union: development of resistance and impact on human and animal health. EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005-CONSULTATION. <http://www.fidin.nl/54601/EMEA-CVMP-reflection-paper-fluroquinolones-food-producing-animals-EU-20060501.pdf> (ultimo accesso 5 Settembre 2011).
- FDA (Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services) (2005). Withdrawal of approval of the new animal drug application for Enrofloxacin in poultry (Docket 2000N-1571, July 28, 2005). <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2005/ucm108467.htm> (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- Forrest A., Nix D. E., Ballow C. H., Goss T. F., Birmingham M. C., Schentag J. J. (1993). Pharmacodynamics of Intravenous Ciprofloxacin in Seriously Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1073-1081.
- Fraatz K., Froyman R., Krebber R. (2006). Pharmacokinetics of florfenicol in turkeys during continuous drinking water medication. *J vet Pharmacol Therap* 29: 239-301.
- Frimodt-Møller N. (2002). How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *Int J Antimicrob Agents* 19: 333-339.

- Garmyn A., Martel A., Froyman R., Ludwig C., Nauwynck H., Haesebrouck F., Pasmans F. (2009a). The effect of reduced treatment time and dosage of enrofloxacin on the course of respiratory disease caused by avian metapneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Poult Sci* 88: 2315-2323.
- Garmyn A., Martel A., Froyman R., Nauwynck H., Duchateau L., Haesebrouck F., Pasmans F. (2009b). Efficacy of four enrofloxacin treatment regimens against experimental infection in turkey poult with avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Pathol* 38(4): 287-292.
- Giacomini C. (2005). Contratti di integrazione e mercato avicolo. In Giacomini C., Defrancesco E., Rossetto L., *La filiera avicola del Veneto*, Veneto Agricoltura, Legnaro, pp. 125-134.
- Gough R. E., Jones R. C. (2008). Avian Metapneumovirus. In Saif Y. M., *Diseases of poultry*, twelfth edition, Blackwell Publishing Professional, Ames, pp 100-110.
- Gous R. M., Morris T. R., (2001). The influence of pelleted feed on the response of growing pullets to photoperiods of less than ten hours. *Br Poult Sci* 42: 203-206.
- Guidobono Cavalchini L. (2008). Allevamento del tacchino. In Cavani C., Castellini C., Cerolini S., Cesari V., Dal Bosco A., Finzi A., Gualtierio L., Guarino M., Guidobono Cavalchini L., Marzoni Fecia di Cossato M., Marelli S.P., Marongiu L., Meluzzi A., Petracci M., Romboli I., Schiavone A., Sicuro B., Toschi I., Trocino M., Xiccato G., Zaniboni L., Zoccarato I., *Avicoltura e conigliicoltura*, Point Veterinaire Italie, Milano, pp. 345-353.
- Guo Q. J., Huang L. L., Fang K., Wang Y. L., Chen D. M., Tao Y. F., Dai M. H., Liu Z. L., Peng D. P., Yuan Z. H. (2010). Population pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken based on retrospective data, incorporating first-pass metabolism. *J vet Pharmacol Therap* 33: 84-94.
- Hwang Y. H., Kim M. S., Song I. B., Lim J. H., Park B. K., Yun H. I. (2009). Altered pharmacokinetics of enrofloxacin in experimental models of hepatic and renal impairment. *Vet Res Commun* 33: 481-487.

- Interchemie (2011). Introflor-100 Oral foglietto illustrativo disponibile on line. <http://www.interchemie.com/veterinary-products/poultry/introflor-100-oral.html> (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- Jacobson E., Gronwall R., Maxwell L., Merrit K., Harman G. (2005) Plasma concentrations of enrofloxacin after single-dose oral administration in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). J Zoo Wildl Med 36: 628-634.
- Knoll U., Glünder G., Kietzmann M. (1999). Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. J vet Pharmacol Therap 22: 239-246.
- Lees P., Concordet D., Aliabadi F. S., Toutain P. L. (2006). Drug selection and optimization of dosage schedules to minimize antimicrobial resistance. In Aarestrup F. M., Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, ASM Press, Washington DC, USA, pp 49-72.
- Lewis P., Morris T. (2006). Photoperiod: conventional programmes. In Lewis P., Morris T., Poultry lighting; the theory and practice, Nottingham University Press, Nottingham, pp. 23-55.
- Lewis P., Danisman R., Gous R. M. (2009). Photoperiodic responses of broilers. I. Growth, feeding behaviour, breast meat yield, and testicular growth. Br Poult Sci 50: 657-666.
- Löhren U., Ricci A., Cummings T. S. (2008). Guidelines for antimicrobial use in poultry. In Guardabassi L., Jensen L. B., Kruse H., Guide to antimicrobial use in animals, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 126-142.
- Lutful Kabir S. M. (2010). Avian Colibacillosis and Salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. Int. J. Environ. Res. Public Health 7: 89-114.
- Marelli P. (2008). Genetica e selezione. In Cavani C., Castellini C., Cerolini S., Cesari V., Dal Bosco A., Finzi A., Gualtierio L., Guarino M., Guidobono Cavalchini L., Marzoni Fecia di Cossato M., Marelli S.P., Marongiu L., Meluzzi A., Petracci M., Romboli I., Schiavone A., Sicuro B., Toschi I., Trocino M., Xiccato G., Zaniboni L., Zoccarato I., Avicoltura e conigliicoltura, Point Veterinaire Italie, Milano, pp. 25-37.

- Marien M., Nauwynck H., Duchateau L., Martel A., Chiers K., Devriese L., Froyman R., Decostere A. (2006). Avian Pathol 35(3): 230-237.
- Marien M., Decostere A., Duchateau L., Chiers K., Froyman R., Nauwynck H., (2007). Efficacy of enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Escherichia coli* O2:K1 dual infection in turkeys following APV priming. Vet Microbiol 121: 94-104.
- Martinez M., McDermott P., Walker R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. Vet J 172 : 10-28.
- McKellar Q. A., Sanchez Bruni S. F., Jones D. G. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. J vet Pharmacol Therap 27: 503-514.
- Mestorino N., Vale C., Haag G., Errecalde J. O. (2011). Depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of broilers. Act of the XXII Latin America Poultry Congress 2011. <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/health/articles/depletion-enrofloxacin-its-metabolite-t1927/165-p0.htm> (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition M31-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Neubig R. R. (2002). L'andamento temporale dell'azione dei farmaci. In Pratt W. B., Taylor P. Farmacologia meccanismi d'azione dei farmaci, Zanichelli, Bologna, pp. 234-285.
- Ozawa M., Baba K., Shimizu Y., Asai T. (2010). Comparison of *in vitro* activities and pharmacokinetics/pharmacodynamics estimations of veterinary fluoroquinolones against Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates. Microb Drug Resist 16: 327-332.
- Pratt W. B. (2002). Farmacoresistenza. In Pratt W. B., Taylor P. Farmacologia meccanismi d'azione dei farmaci, Zanichelli, Bologna, pp. 447-505.
- Prescott J. F. (2000). Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D., Antimicrobial

therapy in Veterinary Medicine, Iowa State University Press, Ames, pp. 27-49.

- Prescott N. B., Wathes C. M. (2002). Preference and motivation of laying hens to eat under different illuminance on eating behaviour. *Br Poult Sci* 43: 190-195.
- Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H. (2003). Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 789: 373-381.
- Regolamento (CE) N. 470/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. [eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:152:0011:0022:IT:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:152:0011:0022:IT:PDF) (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- Regolamento (CEE) N. 2377/90 del Consiglio del 26 giugno 1990 che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. [http://www.normativasanitaria.it/normsan-pdf/CEE/1990/23921\\_1.pdf](http://www.normativasanitaria.it/normsan-pdf/CEE/1990/23921_1.pdf) (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- Regolamento (UE) N. 37/2010 della Commissione del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale. [http://www.normativasanitaria.it/normsan-pdf/0000/31917\\_1.pdf](http://www.normativasanitaria.it/normsan-pdf/0000/31917_1.pdf) (ultimo accesso 23 Gennaio 2012).
- Rybak M.J. (2006). Pharmacodynamics: Relation to Antimicrobial Resistance. *Am J Med* 119: S37-S44.
- Samanidou V. F., Christodoulou E. A., Papadoyannis I. N. (2005a). Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and veterinary drugs by HPLC. *J Sep Sci* 28: 325-331.

- Samanidou V. F., Christodoulou E. A., Papadoyannis I. N. (2005b). Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *J Sep Sci* 28: 555-565.
- Santos M. D. F., Vermeersch H., Remon J. P., Schelkens M., De Backer P., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1997). Administration of Doxycycline hydrochloride via drinking water to turkeys under laboratory and field conditions. *Poult Sci* 76: 1342-1348.
- Sárközy G., Semjén G., Laczay P. (2004). Disposition of norfloxacin in broiler chickens and turkeys after different method of oral administration. *Vet J* 168: 312-316.
- Scaglione F. (2002). Can PK/PD be used in everyday clinical practice. *Int J of Antimicrob Agents* 19: 349-353.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28: 519-542.
- Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duijkeren E., Johnson A. P., Gastra W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* 141: 1-4.
- Singer R. S., Patterson S. K., Meier A. E., Gibson J. K., Lee H. L., Maddox C. W. (2004). Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10):4047-4049.
- Soriano V. E., Vera N. A., Salado C. R., Fernández R. P., Blackall P. J. (2003). *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Dis* 47: 476-480.
- Spoo J. W., Riviere J. E. (1999). Cloramfenicolo, macrolidi, lincosamidi, fluorochinoloni ed antibiotici diversi. In Richard Adams H., *Farmacologia e terapeutica veterinaria*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, pp. 917-954.
- Sullivan M. C., Cooper B. W., Nightingale C. H., Quintiliani R., Lawlor M. T. (1993). Evaluation of the efficacy of ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* by using a mouse protection model. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 234-239.

- Tanner A. C. (2000). Antimicrobial drug use in poultry. In Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D., Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine, Iowa State University Press, Ames, pp. 637-655.
- Toutain P. L., del Castillo J. R., Bousquet-Mélou A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res Vet Sci 73: 105-114.
- Unione Nazionale Avicultori (UNA). <http://www.unionenazionaleavicoltura.it/carniuova.aspx> (ultimo accesso 9 Ottobre 2011).
- Van de Zande S., Nauwynck H., Pensaert M. (2001). The clinical, pathological and microbiological outcome of an Escherichia coli =2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys. Vet Microbiol 81: 353-365.
- Van den Bogaard A. E., London N., Driessen C., Stobberingh E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother 47: 763-771.
- Van Empel P. C. M., Hafez H. M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathol 28: 217-227.
- Van Veen L., Hartman E., Fabri T. (2001). In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. Vet Rec 149: 611-613.
- Vermeulen B., De Backer P., Remon J.P. (2001). Drug administration to poultry. Adv Drug Deliv Rev 54: 795-803.
- Walker R. D. (2000). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D., Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine, Iowa State University Press, Ames, pp.12-26.
- White D. G., Piddock L. J. V., Maurer J. J., Zhao S., Ricci V., Thayer S. G. (2000). Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of Avian *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 44: 2897-2899.
- WHO (World Health Organization) (2011). World health day 2011. Urgent action necessary to safeguard drug treatments. Geneva: WHO; 2011. [Online].

[http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/whd\\_20110406/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/whd_20110406/en/index.html) (5 September 2011, date last accessed).

- Winn W. J., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. (2009). Koneman's. Testo-Atlante di microbiologia diagnostica. Sesta Edizione. Antonio Delfino Editore, Roma, pp 945-1021.
- Wright D. H., Brown G. H., Peterson M. L., Rotschafer J. C. (2000). Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. J Antimicrob Chemother 46: 669-683.
- Zaini M. Z., Tan L. J., Kamaruzaman J. (2008). Phenotypic characteristics, antibiotic susceptibility and pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine 7(5): 133-142.
- Zhao X., Drlica K. (2001). Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. Clin Infect Dis 33(3): 147-156.