

Resflor[®] - Skuteczność działania nowego preparatu w leczeniu zespołu oddechowego bydła

Allan J. Weingarten, DVM • Robert D. Simmons, DVM • Vincent de Haas, DVM • Florence Etoré, PhD • Patrick Lockwood, DVM • Victoria Lewis, DVM, RPh • Mohammad Mushtaq, PhD • Louis S. Crouch, PhD • Ian W. Knemeyer, PhD • Lee Crossman, BSc, CBiol • Kanwal J. Varma, BVSc, MVSc, PhD, Diplomate ACVCP

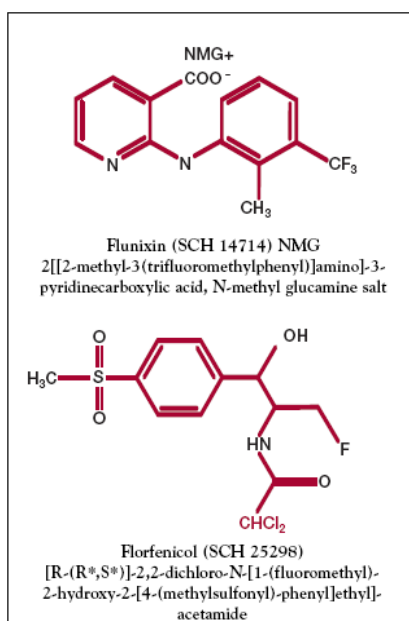
STRESZCZENIE

Konwencjonalne leczenie zespołu oddechowego (BRD) opiera się na podawaniu leków przeciwbakteryjnych. Nowy preparat Resflor[®] poszerza zakres postępowania terapeutycznego zapewniając wielokierunkowe podejście do leczenia zapalenia płuc u cieląt. Wchodzący w skład preparatu związek z grupy niesterydowych leków przeciwzapalnych, fluniksyna, bardzo szybko zmniejsza nasilenie objawów klinicznych, takich jak duszność, osowiałość i gorączka, umożliwiając jednocześnie działanie leku przeciwbakteryjnego. Kliniczne działanie preparatu obserwuje się już po upływie 15 do 30 minut po podaniu leku. Postać farmaceutyczna preparatu Resflor[®] pozwala osiągnąć wyższy, w porównaniu do preparatu Nufloor[®], poziom florfenikolu w ciągu pierwszych 24 godzin od podania i skuteczniej zapobiega zagęszczeniu tkanki płucnej. W niniejszej publikacji przedstawiono wyniki badań przedklinicznych oraz prób klinicznych przeprowadzonych w warunkach terenowych w Europie oraz Stanach Zjednoczonych. Omówiono również właściwości farmakokinetyczne decydujące o dawkowaniu florfenikolu i fluniksyny wchodzących w skład preparatu Resflor[®], a w tym badania potwierdzające wysoki stopień i skuteczność dystrybucji florfenikolu do istotnych z klinicznego punktu widzenia tkanek. Ponadto przedstawiono wyniki badania na doświadczalnym modelu zakażenia *Mannheimia haemolytica*, którego celem było porównanie skuteczności preparatu Resflor[®] oraz innych protokołów leczenia. W warunkach terenowych skuteczność preparatu Resflor[®] oceniano stosując lek w siedmiu stadach bydła mięsnego: pięciu na terenie Stanów Zjednoczonych, natomiast dwóch znajdujących się we Francji. W ciągu pierwszych kilku godzin po podaniu preparat Resflor[®] znacznie złagodził objawy zespołu oddechowego bydła jeszcze przed osiągnięciem przez lek przeciwbakteryjny pełnego działania.

Zespół oddechowy bydła (BRD) jest zasadniczą przyczyną zachorowań i upadków w stadach bydła mięsnego. Zespół BRD, jak się powszechnie uważa, rozwija się w następstwie wzajemnego oddziaływania czynników stresowych układu odpornościowego gospodarza oraz patogenów – ostatecznie bakterie (zazwyczaj *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, i/lub *Haemophilus somnus* [nazywany również *Histophilus somni*]) wnikają do dolnych dróg oddechowych prowadząc do rozwoju zapalenia oskrzeli i płuc.

W leczeniu chorób układu oddechowego bydła rutynowo stosuje się antybiotyki. Terapia skojarzona z wykorzystaniem niesterydowego leku przeciwzapalnego (NLPZ) znacząco przyspiesza odpowiedź organizmu na leczenie, przejawiającą się spadkiem gorączki, i prowadzi do szybszego ustąpienia duszności.^{1,2} Ponadto u cieląt otrzymujących jednocześnie NLPZ zagęszczeniu ulega mniejszy obszar tkanki płucnej.³ Przeprowadzone niedawno badanie wskazuje, że zwierzęta, u których występowały objawy choroby płuc, cechowały się w okresie tuczu niższymi przeciętnymi przyrostami masy ciała w porównaniu do osobników nieprzejawiających wyraźnych zmian wskazujących na uszkodzenie płuc.⁴

Powszechnie stosowanym u bydła lekiem z grupy NLPZ jest megluminian fluniksyny (Banamine®/Finadyne® Roztwór do wstrzyknięć, Schering-Plough Animal Health), natomiast florfenikol (Nufloor® Roztwór do wstrzyknięć, Schering-Plough Animal Health) jest często lekiem przeciwbakteryjnym pierwszego wyboru, stosowanym w terapii zespołu oddechowego bydła. Odmienna rozpuszczalność każdego ze związków ograniczała możliwość połączenia ich w jednym preparacie (Rycina 1), które to ograniczenie ostatecznie wyeliminowano – efektem jest preparat Resflor® Roztwór do wstrzyknięć (Schering Plough Animal Health), który zawiera 300 mg florfenikolu i 16,5 mg fluniksyny w 1 ml roztworu. Podanie florfenikolu w dawce 40 mg/kg m.c. sprawia, że jednocześnie aplikuje się 2,2 mg fluniksyny/kg masy ciała.



Podawanie jednego tylko preparatu, poza wygodą stosowania, skraca czas i ogranicza nakłady pracy związane z leczeniem stada w przypadku wybuchu zespołu oddechowego, a mniejsza liczba wykonywanych iniekcji ogranicza stres zwierząt i poprawia jakość mięsa. Jest to pierwszy preparat zawierający fluniksynę i przeznaczony do podawania drogą podskórną, która jest preferowanym sposobem aplikacji leków w przypadku bydła mięsnego, gdyż powoduje mniejsze uszkodzenie tkanki mięśniowej.

Rycina 1
Wzór strukturalny megluminianu fluniksyny i florfenikolu

W warunkach terenowych, gdy oba preparaty podawano w jednakowej objętości drogą iniekcji podskórnej, Resflor[®] wywoływał słabszy odczyn tkankowy niż Nufloor[®]. Preparat Resflor[®] szybciej przejawia działanie przeciwgorączkowe i bardziej niż Nufloor[®] ogranicza rozwój zmian w płucach. Ponadto optymalizacja formuły preparatu Resflor[®] pozwoliła opracować mechanizm podwyższania szczytowego stężenia florfenikolu w osoczu ponad poziom mierzony po podaniu preparatu Nufloor[®].

UZASADNIENIE DAWKOWANIA PREPARATU – FARMAKOKINETYKA LEKU

Optymalny stosunek florfenikolu do fluniksyny określono porównując poziom każdego ze związków, oznaczony we krwi po podaniu preparatu Resflor[®] lub dopuszczonego do stosowania produktu zawierającego jedną z substancji czynnych (Nufloor[®] lub Finadyne[®]/Banamine[®]).

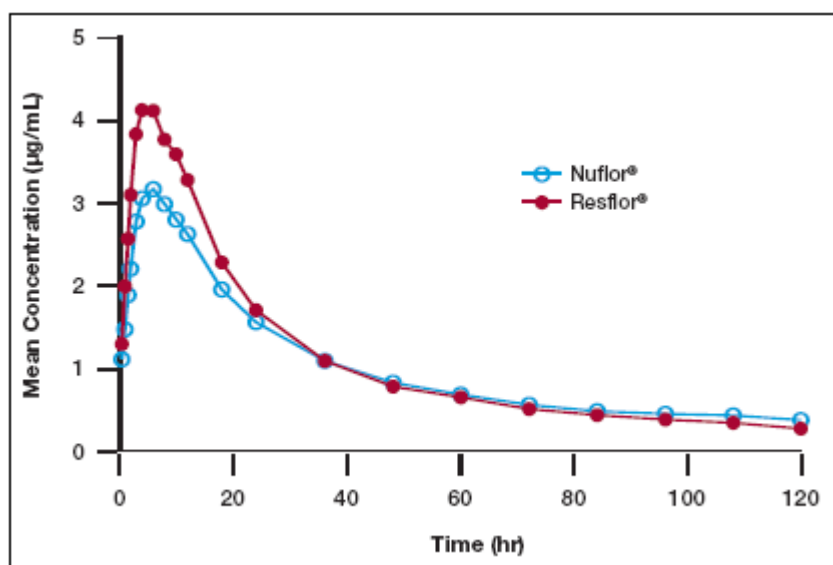
Uzasadnienie dawkowania florfenikolu

- Preparat Resflor[®] pozwala uzyskać znacznie wyższe (~30%) maksymalne stężenie florfenikolu w osoczu (C_{max}) w porównaniu do preparatu Nufloor[®].
- Preparaty Resflor[®] i Nufloor[®] są biorównoważne pod względem parametrów AUC (miara ilości leku przedostającego się do krwiobiegu) oraz T_{MIC90} (czas, przez który stężenie w osoczu przewyższa 1 µg/ml, tj. wartość MIC_{90} najmniej wrażliwego drobnoustroju, przeciw któremu produkt wykazuje działanie).
- Uzasadnienie dawkowania preparatu Resflor[®], tj. 40 mg florfenikolu na kg m.c., stanowi poziom florfenikolu w osoczu co najmniej równy stężeniu oznaczonemu po podaniu preparatu Nufloor[®] w zalecanej dawce.
- Florfenikol ulega rozległej dystrybucji do ważnych z terapeutycznego punktu widzenia tkanek.

Zasadność podawania określonej dawki florfenikolu oceniano w oparciu o oznaczenie biorównoważności florfenikolu po podskórnym (s.c.) podaniu preparatu Resflor[®] i Nufloor[®] Roztwór do wstrzyknięć (300 mg/ml) w dawce 40 mg/kg m.c. (stanowiącej dawkę preparatu Nufloor[®] dopuszczoną do podawania drogą podskórną). Badanie przeprowadzono w oparciu o losowy, prowadzony w dwóch okresach i etapach, model doświadczalny w układzie krzyżowym. Dwadzieścia osiem (28) sztuk bydła opasowego (14 samców i 14 samic) losowo przypisano do jednej z dwóch grup doświadczalnych (I lub II) liczących po 14 zwierząt (po 7 każdej płci). Wymiany grup doświadczalnych dokonano po 56-dniowej przerwie (okres eliminacji leku z ustroju).

Próbki krwi pobierano przed podaniem leku (godzina 0) oraz po upływie 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 i 120 godzin od podania. Poziom florfenikolu w osoczu pozyskanym z próbek krwi oceniano standaryzowaną metodą LC-MS/MS. Parametry farmakokinetyczne w odniesieniu do każdego zwierzęcia we wszystkich fazach badania wyliczono za pomocą oprogramowania WinNonLin[®] Professional Software Version 3.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Biorównoważność dwóch preparatów oceniono w oparciu o wytyczne Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (US FDA Center for Veterinary Medicine Bioequivalence Guidance⁵) oraz CVMP (Bioequivalence Guidelines).

Przebieg krzywych średnie stężenie w osoczu – czas (Rycina 2) wskazuje, że końcowe fazy po osiągnięciu wartości C_{max} są zbliżone w przypadku preparatów Resflor[®] i Nuflor[®].



Rycina 2

Zależność pomiędzy średnim stężeniem florfenikolu w osoczu a czasem obserwowana u bydła po podskórnym podaniu preparatów Resflor i Nuflor (wykres liniowy)

Niemniej jednak po podaniu preparatu Resflor[®], w porównaniu do Nuflor[®], odnotowano w ciągu pierwszych 24 godzin wyższe stężenie florfenikolu w osoczu. Przyczyny tego zjawiska są jeszcze nie w pełni wyjaśnione. Tenże efekt nie wydaje się być związany z działaniem drażniącym, gdyż odczyn tkankowy po iniekcji preparatu Resflor[®] jest zbliżony do preparatu Nuflor[®]. W skład preparatu Resflor[®], w przeciwieństwie do Nuflor[®], wchodzi kwas cytrynowy pełniący rolę stabilizatora. Bez dodatku takiego związku pomiędzy fluniksynam a florfenikolem wytwarzają się wiązania poprzeczne, co prowadzi do szybkiej dezaktywacji produktu. Po podaniu preparatu Nuflor[®] drogą iniekcji, wchłanianie leku przebiega w dwóch zasadniczych fazach: pierwsza zachodzi szybko, gdy produkt ma jeszcze postać roztworu, natomiast wraz z upływem czasu preparat wytrąca się w postaci podobnej do żelu substancji gromadzącej się w przestrzeni podskórnej. Wchłanianie florfenikolu z tej żelopodobnej substancji jest wolniejsze i właśnie ta

właściwość sprawia, że preparat Nufloor® jest produktem długo działającym. Kwas cytrynowy zawarty w preparacie Resflor® może spowalniać wytrącanie się tej substancji.

W Tabelach 1 i 2 przedstawiono parametry farmakokinetyczne florfenikolu.

Tabela 1. Parametry farmakokinetyczne florfenikolu odnotowane u bydła (n=28) otrzymującego preparat Resflor®

	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{max} (hr)	AUC_{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	$AUC_{\infty}(\text{obs})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	$AUMC_{last}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mL}$)	$AUMC_{\infty}(\text{obs})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mL}$)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (obs) (hr)	T_{MIC90} (hr)
Mean	4.31	5.46	132.76	156.04	4381.75	9430.60	53.68	59.46	39.54
Std Error	0.21	0.32	3.92	3.94	158.57	999.55	3.98	5.39	1.73
% CV	25.24	31.30	15.64	13.38	19.15	56.08	39.19	47.97	23.13

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne florfenikolu odnotowane u bydła (n=28) otrzymującego preparat Nufloor®

	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{max} (hr)	AUC_{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	$AUC_{\infty}(\text{obs})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	$AUMC_{last}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mL}$)	$AUMC_{\infty}(\text{obs})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{mL}$)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (obs) (hr)	T_{MIC90} (hr)
Mean	3.23	6.00	122.89	165.31	4653.44	15133.74	72.00	87.42	39.14
Std Error	0.15	0.27	3.42	5.77	122.61	1736.34	5.22	6.79	1.45
% CV	24.50	24.00	14.71	18.47	13.94	60.71	38.33	41.11	19.66

(obs) = ozn (oznaczona) Hr = godz. Mean = wartość średnia Std Err = błąd standardowy
% CV =

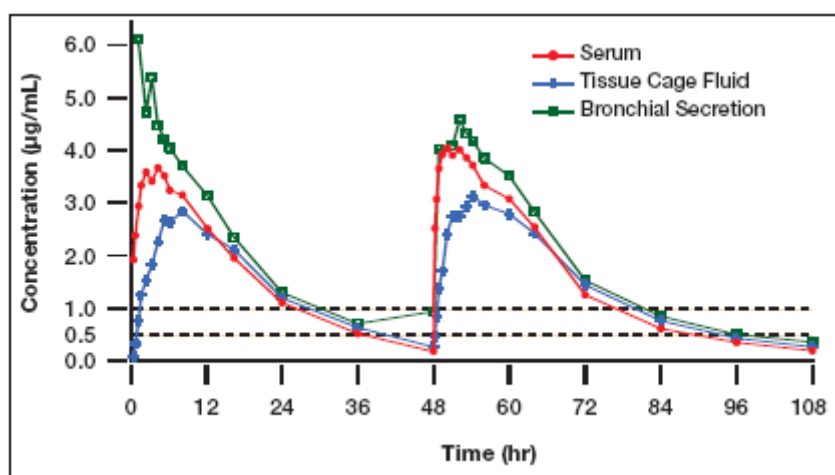
Analiza statystyczna, której celem było porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych notowanych u samców i samic, nie wykazała różnic we wskaźnikach, takich jak C_{max} , AUC_{last} oraz $T_{1/2}$, pomiędzy zwierzętami odmiennej płci.

Biorównoważność parametrów oceniano dla łącznie dla wszystkich danych oraz oddzielnie dla parametrów oznaczonych u samców i samic. Porównanie danych metodą analizy wariancji wykazało, że preparat Resflor® nie był biorównoważny preparatowi Nufloor® pod względem parametru C_{max} . Przedział ufności wynoszący 90% dla przekształconego logarymicznie parametru C_{max} dla preparatów Resflor® i Nufloor® nie mieścił się w ustalonym przedziale od 80 do 125% wymaganym do wykazania biorównoważności, natomiast 90% przedziały ufności dla dwóch innych klinicznie istotnych parametrów, AUC_{last} i T_{MIC90} , mieściły się w granicach biorównoważności, odpowiednio pomiędzy 80 a 125% oraz 80 a 120%.

Przeciętna wartość C_{max} florfenikolu była w przypadku preparatu Resflor® wyższa o około 30% w porównaniu do preparatu Nufloor®, wskazując, że florfenikol jest łatwiej wchłaniany z formuły preparatu Resflor®. Całkowita ilość leku w krwiobiegu (AUC_{last}) oraz czas utrzymywania się stężenia ponad wartość MIC_{90} (T_{MIC90}) wynoszącą 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ były jednakowe dla obu preparatów

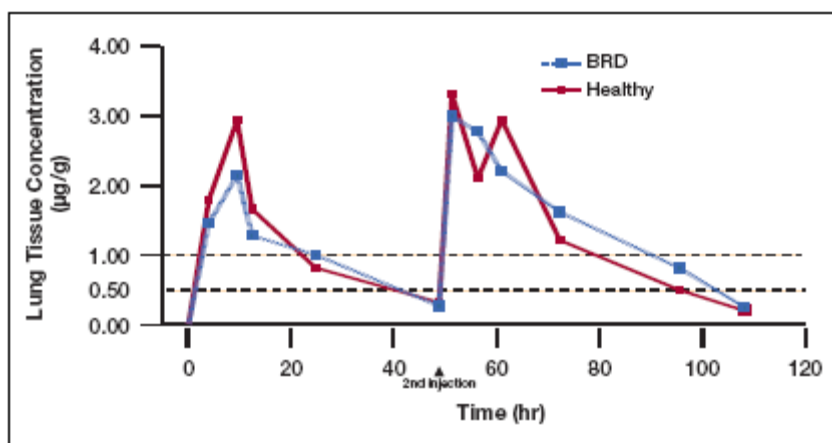
– stąd oczekuje się, że preparat Resflor[®] przejawia skuteczność kliniczną, co najmniej równą preparatowi Nuflor[®].

Florfenikol jest szybko rozprowadzany do tkanek. Opublikowane wcześniej wyniki badań (Ryciny 3 i 4) potwierdzają przenikanie florfenikolu do najważniejszej tkanki, tj. do płuc. Florfenikol w płucach i oskrzelach osiąga niemalże to samo stężenie, co w surowicy.⁶ Ponadto poziom antybiotyku jest jednakowy w zdrowej i zmienionej zapalnie tkance płucnej.⁷ Jako że w ciągu pierwszych 24 godzin po podaniu preparatu Resflor[®] notuje się wyższy, w porównaniu do preparatu Nuflor[®], poziom florfenikolu w osoczu, wydaje się, że stężenie leku w płucach będzie również wyższe.



Rycina 3

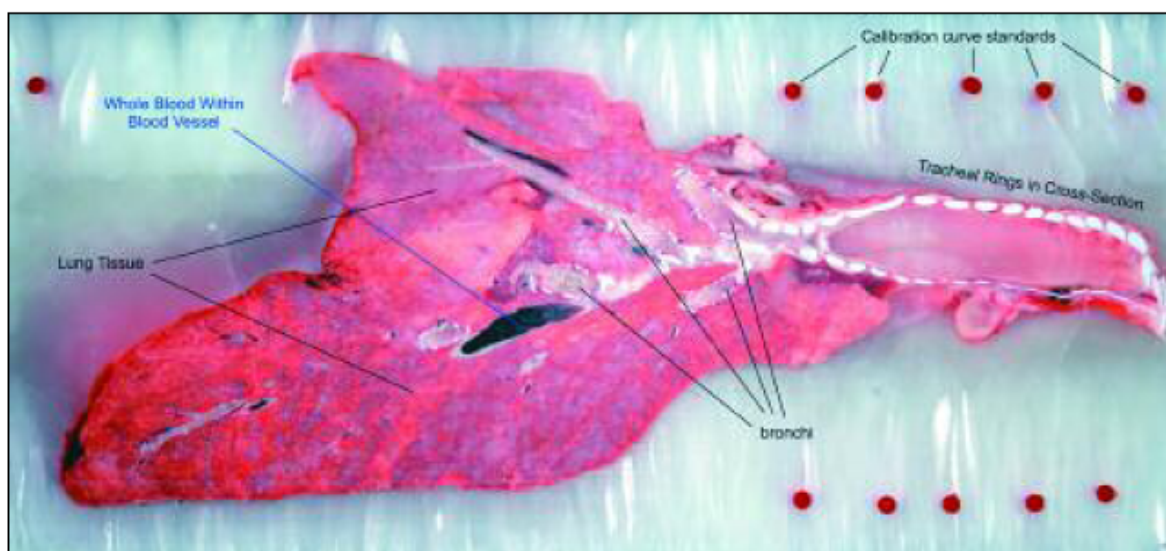
Zależność pomiędzy średnim stężeniem florfenikolu w surowicy, wydzielinie oskrzelowej i płynie tkankowym a czasem po dwukrotnym podaniu preparatu Nuflor drogą iniekcji domięśniowej (20 mg/kg m.c. w odstępie 48 godzin) u 6 cieląt rasy mięsnej (za: Varma, 1994).



Rycina 4

Stężenie florfenikolu w tkance płucnej (µg/g) u zdrowych cieląt oraz cieląt z zespołem BRD, oznaczone po dwukrotnym podaniu preparatu Nuflor (20 mg/kg m.c.) drogą iniekcji domięśniowej w odstępie 48 godzin (za; Varma i wsp., 1996).

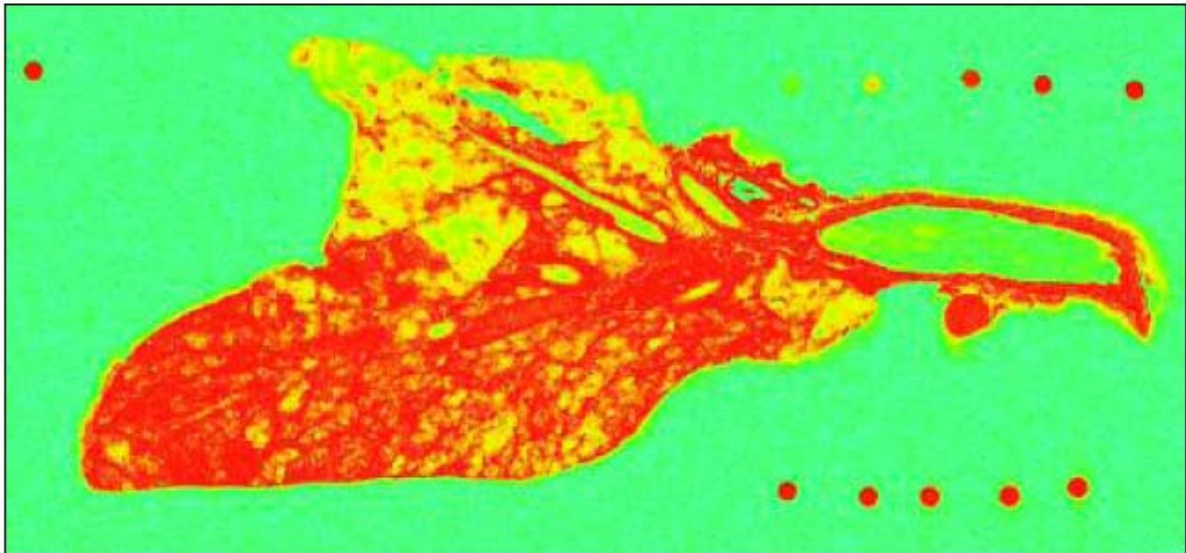
Rozległą tkankową dystrybucję sygnału radioaktywnego florfenikolu znakowanego ^{14}C wykazano w badaniu techniką autoradiografii (**Ryciny 5 -11**). Preparat Resflor[®] zawierający florfenikol znakowany ^{14}C wykorzystano w badaniu, podczas którego oceniano rozkład sygnału radioaktywnego w istotnych z terapeutycznego punktu widzenia tkankach. Zdrowemu cielęciu podano drogą podskórną jedną dawkę preparatu ^{14}C - Resflor[®], a 6 godzin po podaniu (szacowana wartość T_{max}) cielę poddano eutanazji. Z uwagi na wielkość zwierzęcia niemożliwe było wykonanie autoradiografii całego ciała. Pobrano natomiast wycinki określonych tkanek, które natychmiast zanurzano w mieszaninie heksanu i suchego lodu w celu szybkiego zamrożenia oraz zachowania właściwego anatomicznego kształtu. Z uwagi na elastyczność struktur tworzących płuca, tchawicę i płuca jeszcze przed zamrożeniem wypełniono zawiesiną 1% karboksymetylocelulozy. Podczas manipulacji tkanką płucną przed jej zamrożeniem szczególną uwagę zwracano na uniknięcie naciągania bądź ucisku płuc. Niemniej jednak mniejsze płyty płuc zostały nieznacznie rozciągnięte (**Ryciny 5 i 6**), co przyczyniło się do wychwytu słabszego sygnału ^{14}C z tych właśnie miejsc.



Rycina 5

Płuco zatopione w zmrożonym bloku karboksymetylocelulozowym pobrane od cielęcia, któremu podano ^{14}C -florfenikol (preparat Resflor zawierający florfenikol znakowany izotopem radioaktywnym).

Zamrożone tkanki umieszczono w specjalnym pojemniku, który następnie wypełniono schłodzonym 1,5% wodnym roztworem karboksymetylocelulozy, po czym cały pojemnik zamrożono zanurzając go w mieszaninie heksan-suchy lód. Po zmrożeniu całego bloku, poprzez nawiercenie w nim otworów, pobrano próbki do kontroli jakości (KJ; w celu potwierdzenia jednakowej grubości wycinków) oraz celem opracowania krzywej wzorcowania (KW; pomiar ilościowy).



Rycina 6

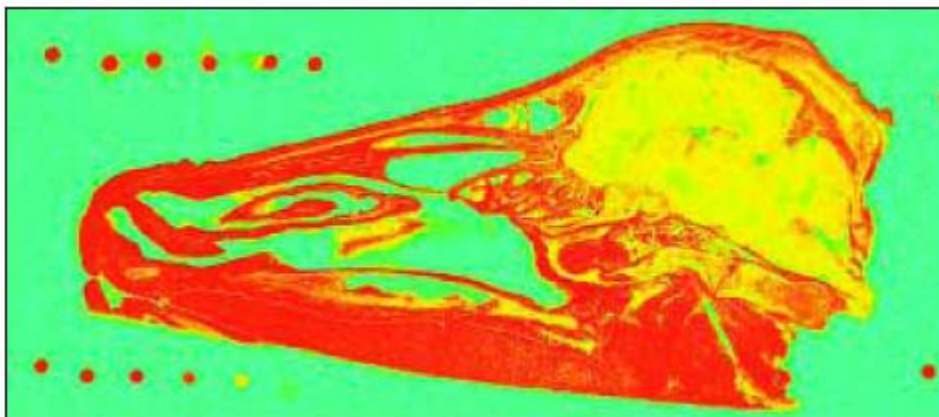
Autoradiogram wycinka (o grubości 30 mikronów) płuca uzyskany poprzez cięcie bloku przedstawionego na poprzednim zdjęciu. W tkance płucnej (pęcherzyki i oskrzela) widoczny jest wysoki poziom sygnału radioaktywnego, który na przeważającej powierzchni płuc zbliżony jest do poziomu oznaczanego w pełnej krwi. Mniejsze płaty płuc, widoczne ponad płatem głównym, zdają się wykazywać mniejsze natężenie sygnału radioaktywnego pochodzącego od ^{14}C -florfenikolu, co najprawdopodobniej jest artefaktem, gdyż płaty płuc są jakby nieco rozciągnięte (Rycina 5) i w efekcie dają słabszy sygnał. Poziom radioaktywności jest szczególnie wysoki w chrząstce tchawiczej/oskrzeli.



Rycina 7

Przekrój poprzeczny głowy cielęcia, któremu podano preparat Resflor[®] zawierający florfenikol znakowany ^{14}C .

Wszystkie standardowe próbki przygotowano dla docelowych stężeń radiowęglu w heparynizowanej pełnej krwi bydlęcej, do której dodano różne ilości glukozy znakowanej ^{14}C i następnie wprowadzono do wywierconych wcześniej otworów w zamrożonym bloku.



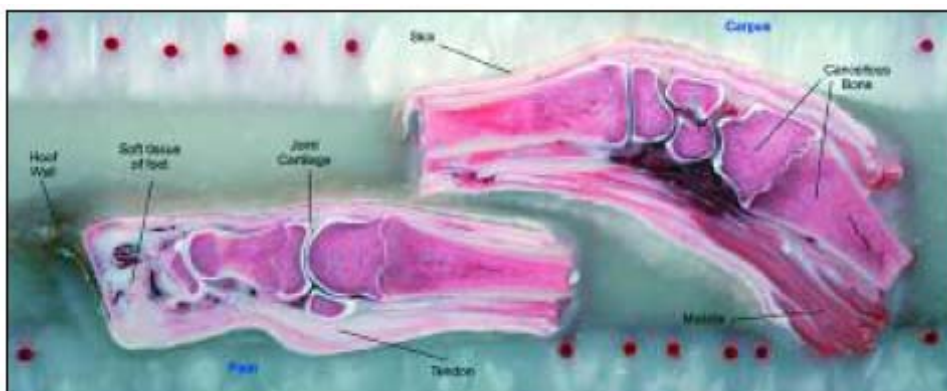
Rycina 8

Autoradiogram wycinka (o grubości 30 mikronów) tkanki pozyskanego poprzez cięcie zmrożonego bloku przedstawionego na Rycinie 7. Wysoki poziom radioaktywności widoczny jest w skórze, tkance mięśniowej (język) oraz tkance gruczołowej (gruczoły ślinowe). Małżowiny nosowe również wydzielają wysoki poziom sygnału radioaktywnego pochodzącego od florfenikolu znakowanego ^{14}C . Wyraźnie widoczne jest przenikanie sygnału do tkanki nerwowej (mózg i rdzeń kręgowy). Wyniki te są spójne z parametrami farmakokinetycznymi odnotowanymi przez De Craene i wsp.,⁸, którzy podają, że florfenikol dobrze wnika do płynu mózgowo-rdzeniowego u cieląt, a dostępność związku po jednym podaniu wynosi 46% dostępności w osoczu.

Przekroje strzałkowe o grubości około 30 μm pozyskano za pomocą dwuręcznego mikrotomu o dużej powierzchni ostrza, znajdującego się w komorze zamrażalniczej (Leica Microsystems, Inc., Deerefield, IL). Pozyskane wycinki poddano następnie liofilizacji, pozostawiając je w komorze mikrotomu na około 24 godziny. Liofilizowane wycinki umocowano na ramce do opracowania plakatów, po czym przykryto przejrzystą folią polietylenową przed przyłożeniem do świeżo wyczyszczonych (BAS Imaging Plate Eraser, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japonia) płytek obrazujących (BAS-MS 40 x 25 cm Fuji) znajdujących się w kasecie do naświetlań, którą następnie na czas ekspozycji umieszczono w kasie ołowianej.

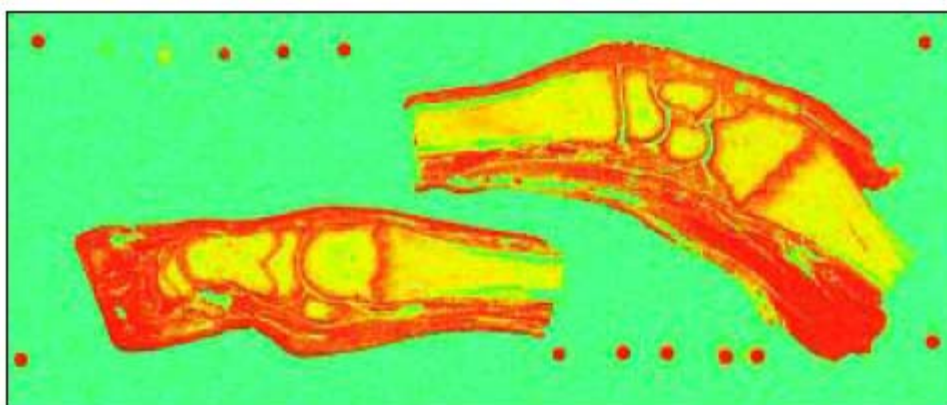
Po ekspozycji trwającej około 96 godzin wykonano skanowanie umocowanych na oprawach wycinków (skaner FUJIFILM BAS-2500 scanner, Fuji Biomedical Products, Japonia) pod kontrolą oprogramowania umożliwiającego analizę obrazu (SeeScan2, version 2.0.43.66 Lablogic, Wielka Brytania). Pomiarzy densytometryczne skali szarości przeprowadzono za pomocą oprogramowania analizy obrazu SeeScan2. Jednakże w okresie opracowywania niniejszej publikacji wyniki pełnej analizy nie były dostępne. Autoradiogramy w skali szarości wybarwiono wykorzystując oprogramowanie SeeScan2, dzięki czemu miejsca o wysokiej gęstości radiograficznej mają „cieplą” barwę, natomiast obszary o małej gęstości lub pozbawione sygnału przedstawia „chłodny” kolor. Stąd uszeregowanie miejsc od wysokiej do niskiej koncentracji sygnałów w tkankach jest przedstawione, odpowiednio, jako barwa czerwona > żółta > zielona > niebieska.

Nasilenie sygnału radioaktywnego pochodzącego od znakowanego florfenikolu w tkance płucnej jest podobne do stężenia oznaczanego w pełnej krwi (Rycina 6). We wszystkich pozostałych strukturach układu oddechowego, takich jak chrząstki tchawicze / oskrzeli (Rycina 6) oraz małżowiny nosowe (Rycina 8), obserwuje się również bardzo wysokie stężenia. Wnikanie do tkanek miękkich, jak skóra i mięśnie, oraz tkanek miękkich dalszych odcinków kończyn, jest znaczne (Rycina 10). Wysoki poziom aktywności florfenikolu znakowanego ^{14}C stwierdza się w tkance gruczołowej, takiej jak gruczoły ślinowe (Rycina 8). Wyraźnie widoczne jest ponadto przenikanie do tkanek, których penetracja przez antybiotyki jest zwykle słaba, mianowicie do mózgu (Rycina 8), kości i chrząstek stawowych (Rycina 10), jak również do różnych struktur gałki ocznej, a szczególnie do tkanki gruczołów łzowych (Rycina 11).



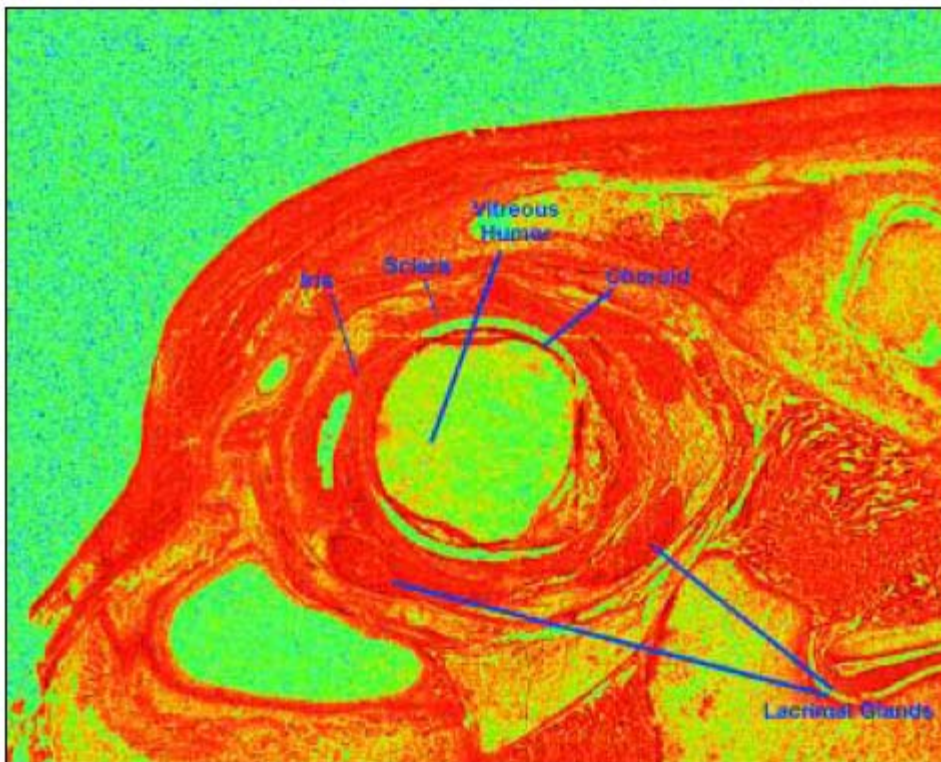
Rycina 9

Przekrój poprzeczny stopy i nadgarstka cielęcia któremu podano preparat Resflor[®] zawierający florfenikol znakowany ^{14}C .



Rycina 10

Autoradiogram wycinka (o grubości 30 mikronów) tkanki pozyskanego poprzez cięcie zmrożonego bloku przedstawionego na Rycinie 9. Wyraźnie widoczne jest przenikanie ^{14}C do mięśni, ścięgien, chrząstki stawowej oraz tkanki miękkiej stopy, natomiast brak jest sygnału w obrębie ściany racicy, gdyż jest to w zasadzie martwa i nieunaczyniona tkanka, do której nie przenika żaden lek. Wysokie natężenie sygnału radioaktywnego cechuje istotę gąbczastą kości/szpiku, natomiast nie jest notowane w istocie korowej.



Rycina 11

Autoradiogram wycinka (o grubości 30 mikronów) tkanki na wysokości gałki ocznej. Po upływie 6 godzin od podania preparatu poziom sygnału radioaktywnego w cieczy szklistej nieznacznie przekracza granicę wykrywalności. Znacznie silniejszy sygnał pochodzący od ^{14}C - florfenikolu stwierdza się w innych strukturach gałki ocznej, a szczególnie w gruczołach łzowych, naczyniówce, twardówce oraz tęczęwce. Fragment soczewki widoczny w liofilizowanym preparacie nie jest wykrywalny w badaniu techniką autoradiografii.

UZASADNIENIE DAWKOWANIA FLUNIKSYNY

- Po podaniu preparatu Resflor[®] drogą podskórną, fluniksyna ulega szybkiemu wchłanianiu.
- Przebieg krzywych średnie stężenie fluniksyny w osoczu – czas w ciągu 1 godziny po dożylnym podaniu preparatu Finadyne[®] i podskórnym (s.c.) preparatu Resflor[®] jest bardzo podobny. W oparciu o takie wyniki założono, że dawka fluniksyny w preparacie Resflor[®] powinna być taka sama jak zawartość w preparacie Banamine[®] /Finadyne[®], tj. 2,2 mg/kg masy ciała. Z uwagi jednak na niższą biodostępność, optymalną dawkę fluniksyny zawartą w preparacie Resflor[®] ustalono i potwierdzono w warunkach klinicznych u bydła z zespołem BRD.

Optymalne stężenie fluniksyny określono porównując parametry farmakokinetyczne dla fluniksyny po jednokrotnym jej podaniu drogą dożylną (Banamine®/Finadyne®) bądź podaniu jednej dawki preparatu Resflor® droga podskórną.

Badanie opierało się na losowym, prowadzonym w dwóch okresach i etapach oraz w układzie krzyżowym schemacie doświadczalnym. Dwanaście sztuk bydła (6 samców i 6 samic) w wieku opasowym losowo przydzielono do dwóch grup (I lub II) liczących po 6 zwierząt każdej płci). Początkowo bydło w grupie I otrzymało fluniksynę jednokrotnie w dawce 2,2 mg/kg m.c. droga podskórną w postaci preparatu Resflor® Roztwór do wstrzyknięć, natomiast zwierzętom w grupie II podano dożylnie tę samą dawkę fluniksyny w preparacie Banamine®/Finadyne®. Po upływie co najmniej 47-dniowego okresu przerwy w grupach zastosowano odwrotne leczenie. Próbkę krwi pobierano w czasie 0 (przed podaniem) oraz 5, 10, 15, 30, 45 i 60 minut, a następnie 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24 i 36 godzin po podaniu. W osoczu pozyskanym z próbek krwi poziom fluniksyny oznaczono standaryzowaną metodą LC-MS/MS.

Zebrane w **Tabeli 3** parametry farmakokinetyczne wyliczono niezależnie od modelu kompartmentowego za pomocą oprogramowania WinNonlin® Professional Version 3.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

Tabela 3. Przeciętne wartości parametrów farmakokinetycznych dla fluniksyny odnotowane po zastosowaniu u bydła

Resflor® (SC)								
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{last} (ng•hr/mL)	$AUC_{0-\infty}(obs)$ (ng•hr/mL)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (obs) (hr)	F* (%)	F** (%)
N	12	12	12	12	12	12	12	11
Mean	2900.57	1.31	10199.96	10859.32	6.89	8.08	76.56	69.45
SE	1414.35	0.28	954.41	989.65	0.90	0.52	8.45	5.01
% CV	169	73	32	32	45	22	38	24
Finadyne®/Banamine® (IV)								
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{last} (ng•hr/mL)	$AUC_{0-\infty}(obs)$ (ng•hr/mL)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (obs) (hr)		
N	–	–	12	12	12	12		
Mean	–	–	13956.35	14675.86	6.22	4.28		
SE	–	–	952.08	895.94	1.46	1.17		
% CV	–	–	24	21	81	95		

*F (bioavailability) was calculated as $AUC(Resflor® SC)/AUC(Finadyne® IV) \cdot 100$

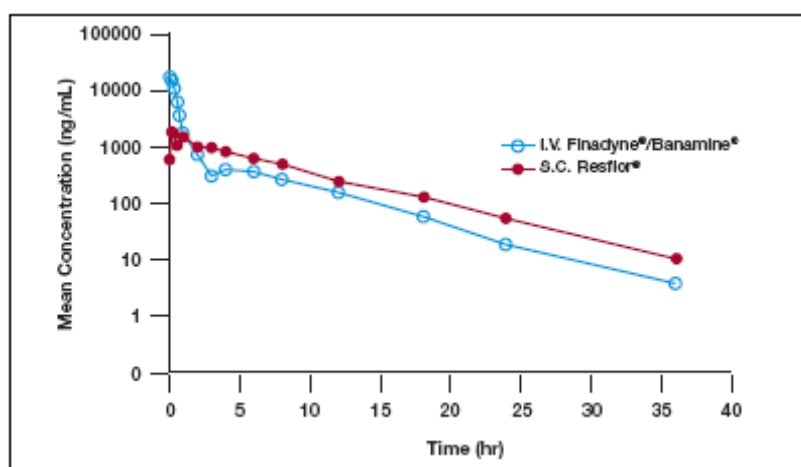
**Excludes an anomalous result from one animal

SE – błąd standardowy

* F (biodostępność) obliczono według wzoru: $AUC(Resflor® s.c.) / AUC(Finadyne® i.v.) \cdot 100$

** z wyłączeniem nieprawidłowego wyniku odnotowanego u jednego zwierzęcia

Na **Rycinie 12** zamieszczono wykres przedstawiający krzywą średnie tężenie w osoczu – czas po podskórnym podaniu preparatu Resflor[®] i dożylnym Banamine[®]/Finadyne[®]. Po podaniu dożylnym wysokie C_{max} odnotowano, jak oczekiwano, niemalże natychmiast, a wchłanianie fluniksyny po podskórnym podaniu preparatu Resflor[®] było szybkie, osiągając wartość T_{max} wynoszącą przeciętnie 1,31 godziny. Analizując krzywe: przeciętne stężenie – czas, wyraźnie widoczne jest, że końcowa faza wchłaniania jest niemalże równoległa i podobna po podaniu podskórnym (Resflor[®]) i dożylnym (Banamine[®]/Finadyne[®]), co potwierdza zbliżony okres półtrwania obu postaci preparatów (wartość średnia \pm OS: 6,89 \pm 0,90 godzin dla podania s.c. i 6,22 \pm 1,46 godzin w przypadku iniekcji i.v.).



Rycina 12

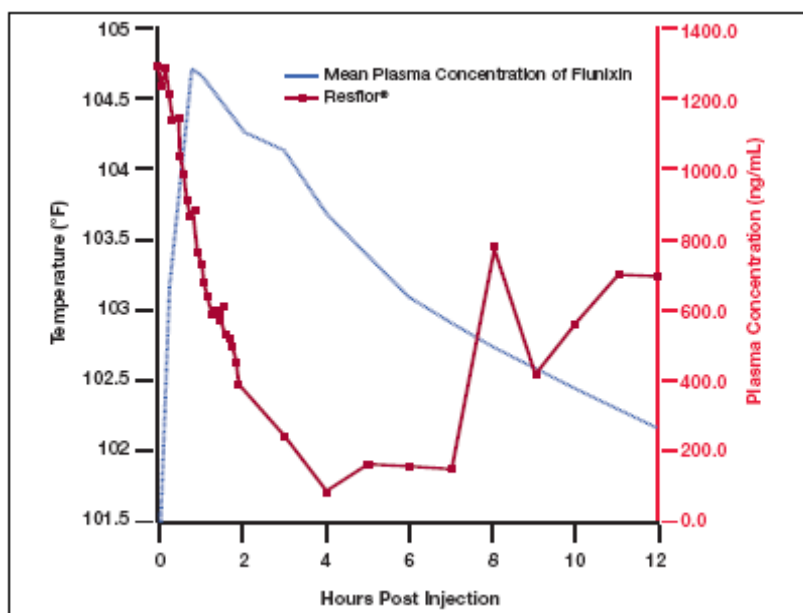
Zależność średniego stężenia fluniksyny w osoczu od czasu po podaniu bydłu obu płci (n=12) preparatu Resflor[®] drogą podskórną i Finadyne[®]/Banamine[®] drogą dożylną.

W ciągu 1 godziny od podania przeciętne stężenie fluniksyny w osoczu jest zbliżone w przypadku iniekcji dożylnej preparatu Banamine[®]/Finadyne[®] i podskórnej preparatu Resflor[®], co wskazuje, że optymalna dawka fluniksyny w preparacie Resflor[®] wynosi właśnie 2,2 mg/kg m.c., tak jak zalecone dawkowanie fluniksyny zawartej w preparacie Finadyne[®]/Banamine[®]. (Dawka fluniksyny stosowana u bydła jest nieco odmienna zależnie od rynku zbytu. W Stanach Zjednoczonych zalecana dawka podawana dożylnie wynosi 1,1 – 2,2 mg/kg m.c. W niektórych postaciach preparatu, np. Finabiotic[®]/Finoxaline[®] podawana drogą domięśniową dawka równa jest 2 mg/kg m.c.) Jako że wartość AUC po podskórnym podaniu preparatu Resflor[®] jest o 25 do 30% niższa w stosunku do wartości oznaczonej po dożylnym podaniu tej samej dawki w postaci preparatu Finadyne[®]/Banamine[®], zasadność dawkowania fluniksyny potwierdzono w badaniu przeprowadzonym w warunkach klinicznych.

SZYBKOŚĆ PRZEJAWIANIA DZIAŁANIA PRZECIWGORĄCZKOWEGO

Działanie przeciwgorączkowe fluniksyny jest doskonale udokumentowane, natomiast jak dotąd nie oznaczano momentu, w którym lek zaczyna je przejawiać. W tym celu u 15 sztuk bydła pochodzących ze stada opasów w stanie Texas, przejawiających objawy zespołu oddechowego, zastosowano preparat Resflor® (n=8) lub Draxxin® (tulatromycyna, Pfizer Animal Health) (n=7). Pierwsze cielę zakwalifikowane do badania przydzielono do grupy leczonej preparatem Resflor®, natomiast kolejne do grupy otrzymującej Draxxin®, po czym kwalifikacje prowadzono naprzemiennie aż do pogrupowania wszystkich 15 cieląt. Po podaniu leków ciepotę wewnętrzną mierzono rektalnie w odstępach 5-minutowych przez pierwsze 2 godziny, a następnie, co godzinę.

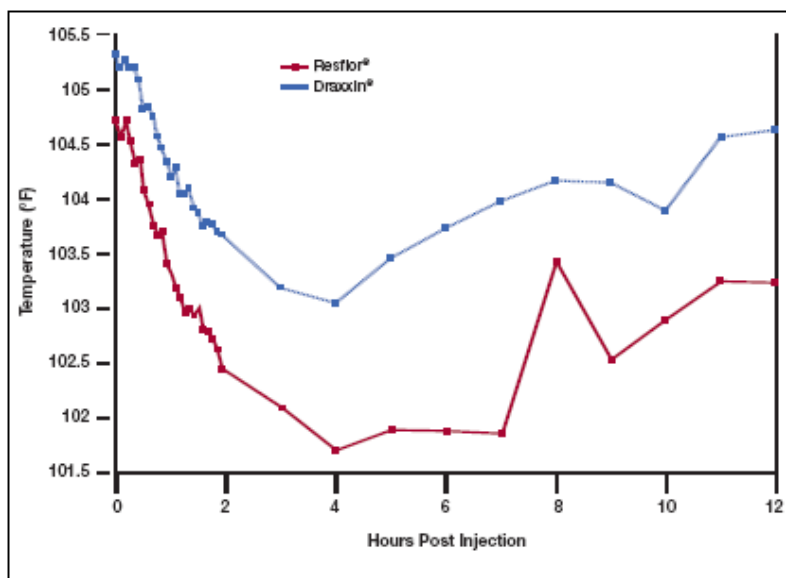
Na **Rycinie 13** przedstawiono porównanie pomiarów ciepłoty wewnętrznej po podaniu preparatu Resflor® (kolor niebieski) i parametrów farmakokinetycznych (kolor czerwony) omówionych powyżej. Szybkiemu wchłanianiu fluniksyny z preparatu Resflor® towarzyszy obserwowane już po upływie krótkiego czasu działanie przeciwgorączkowe.



Rycina 13

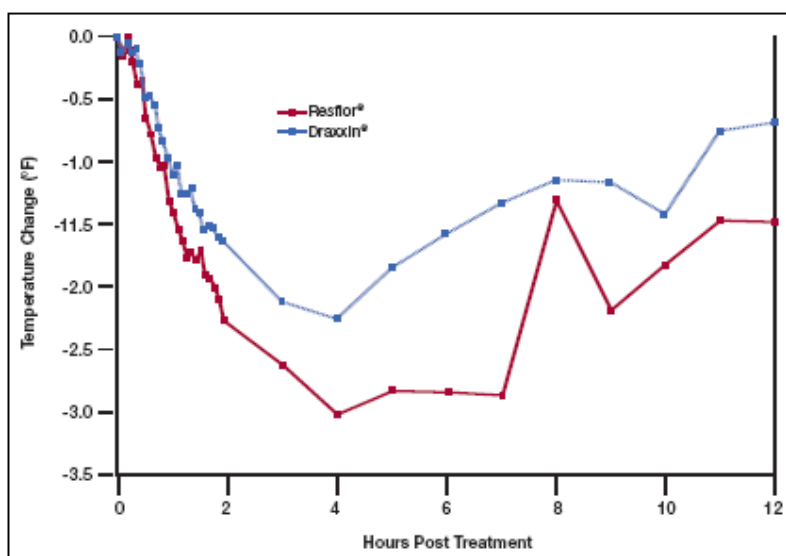
Celem wykresu jest zobrazowanie farmakokinetyczno-farmakodynamicznej (pK – PD) zależności w odniesieniu do fluniksyny wchodzącej w skład preparatu Resflor®. Przeciętne stężenia fluniksyny w osoczu (kolor czerwony) po podskórnym podaniu preparatu Resflor®, odnotowane w przedstawionym powyżej badaniu, naniesione są na wykres przedstawiający średnią temperaturę rektalną (kolor niebieski) mierzoną u 8 zwierząt z zespołem BRD (naturalne zakażenie). Wykres, pomimo braku bezwzględnej zależności pK-PD powodowanej działaniem florfenikolu prowadzącym do spadku temperatury, obrazuje jednak szybkość wchłaniania fluniksyny z preparatu Resflor® i towarzyszący temu spadek temperatury rektalnej. Już w przeciągu 15 do 30 minut od podania preparatu Resflor® wyraźnie widoczny jest spadek gorączki.

Na **Rycinach 14 i 15** zebrano dane dotyczące preparatu Draxxin®. Zwierzęta otrzymujące preparat Draxxin®, pomimo naprzemiennej kwalifikacji do badania, wykazywały początkowo (przed leczeniem) znacznie wyższą średnią temperaturę rektalną w porównaniu do grupy leczonej preparatem Resflor®. Przyjmując ten parametr (początkową temperaturę) za współzmienną, u bydła, które otrzymało preparat Resflor®, odnotowano wyraźnie niższą średnią temperaturę rektalną po upływie 0,33, 0,58, 0,67, 0,75, 0,92, 1,0, 1,08, 1,16, 1,25, 1,33, 1,45, 1,5, 1,58, 1,67, 1,75, 1,83, 1,92, 3,4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 i 12 godzin po podaniu w porównaniu do zwierząt otrzymujących preparat Draxxin®. Pomimo przyjęcia współzmiennnej i z uwagi na wyższą początkową średnią temperaturę rektalną w grupie Draxxin®, porównanie należy poddać krytycznej ocenie, gdyż grupa bydła otrzymującego preparat Draxxin® może przedstawiać odmienną populację (tj. stan kliniczny tych zwierząt w momencie kwalifikacji do badania mógł być gorszy niż osobników w grupie Resflor®).



Rycina 14

Porównanie średniej temperatury rektalnej u bydła z rozpoznanym zespołem BRD, pochodzącym ze stada bydła opasowego w stanie Teksas, w którym zespół BRD występuje i jest leczony za pomocą preparatu Resflor® bądź Draxxin®. Na wykresie przedstawiono czas utrzymywania się działania przeciwgorączkowego po zastosowaniu preparatu Resflor® (n=8) oraz Draxxin® (n=7).



Rycina 15

Porównanie zmian przeciętnej temperatury rektalnej u bydła ze stada zlokalizowanego w stanie Teksas, w którym rozpoznano zespół oddechowy i podjęto leczenie podając preparat Resflor® lub Draxxin®.

Fluniksyna – badania kliniczne potwierdzające zasadność dawkowania

- W leczeniu bydła z zespołem oddechowym, który rozwinął się po zakażeniu drogą naturalną, nie zaobserwowano jakiegokolwiek korzystnego działania związanego ze zwiększaniem zawartości fluniksyny w preparacie Resflor[®].

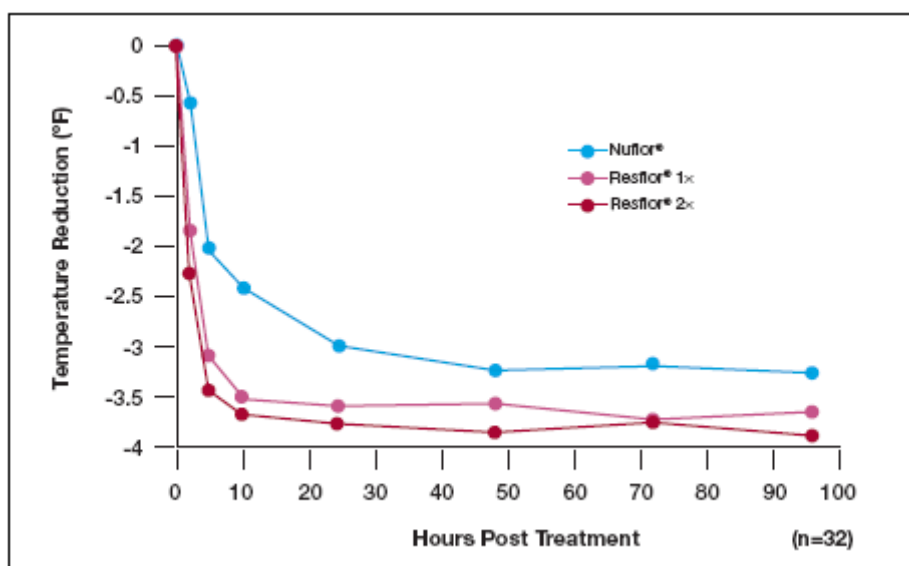
Dziewięćdziesiąt sześć (96) sztuk bydła przejawiającego typowe objawy chorób ze strony układu oddechowego losowo przypisano do jednej z trzech następujących grup doświadczalnych, otrzymujących lek w objętości 20 ml/150 kg masy ciała:

Leczenie	Dawkowanie	Droga podania	Liczba zwierząt / Leczenie
Resflor [®] 1X	florfenikol 40 mg/kg + fluniksyna 2.2 mg/kg	s.c	32
Resflor [®] 2X*	florfenikol 40 mg/kg + fluniksyna 4.4 mg/kg	s.c	32
Nufloor [®]	florfenikol 40 mg/kg	s.c	32

*Podwójne stężenie (tj, 33 mg/ml) fluniksyny w porównaniu do postaci preparatu Resflor[®] 1X (16.5 mg/ml)

Ciepłotę wewnętrzną mierzono rektalnie w różnych punktach czasowych w okresie całego badania. Wyniki przedstawione są na **Rycinie 16**. Począwszy od godziny 0 w dniu 0 badania aż po dzień 1, we wszystkich grupach doświadczalnych zaobserwowano spadek przeciętnej temperatury rektalnej, a w grupie otrzymującej preparat Nufloor[®] spadek ten był najmniejszy. W opisywanym badaniu korzyści wynikające z zastosowania fluniksyny są wyraźnie widoczne. Działanie przeciwgorączkowe było zbliżone w obu grupach otrzymujących Resflor[®] i jednocześnie silniejsze w porównaniu do podania preparatu Nufloor[®].

W 6 dniu badania cielęta poddano eutanazji celem oceny zakresu oraz charakteru i stopnia zagęszczenia tkanki płucnej powodowanej rozwojem zespołu BRD. Podczas badania sekcyjnego każde płuco usunięto z jamy klatki piersiowej nie naruszając jego struktur, następnie wykonano zdjęcie cyfrowe, a poszczególne płaty płuc po prawej i lewej stronie oceniono wykorzystując skalę opisującą stopień zagęszczenia płuc, opartą o badanie poprzez oglądanie i omacywanie. Oceny (wynik w %) dokonywano przypisując wartość według następującej skali: 0,1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100.



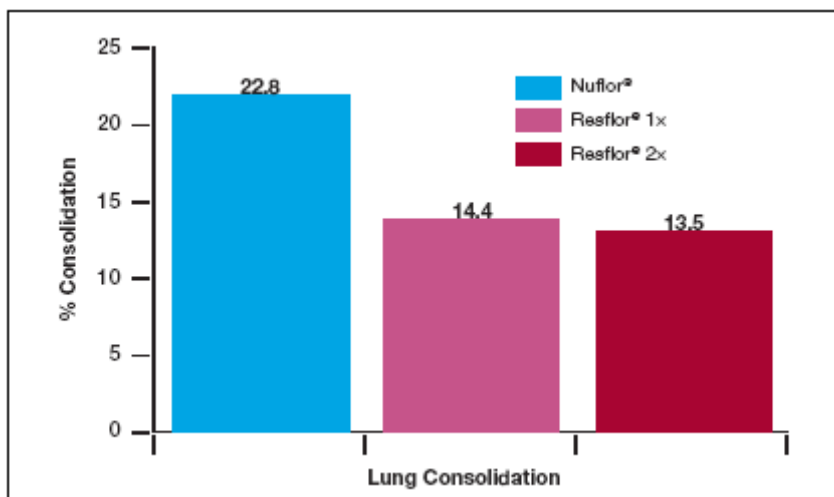
Rycina 16

Wpływ zawartości fluniksyny w preparacie Resflor[®] na skuteczność działania przeciwgorączkowego u bydła z zespołem BRD. We wszystkich trzech schematach leczenia preparaty podano jednokrotnie drogą podskórną w dawce 40 mg flufenikolu/kg m.c. (20 ml/150 kg m.c.). W grupie Resflor[®] 1X dawka fluniksyny wynosiła 2,2 mg/kg m.c., natomiast w grupie Resflor[®] 2X 4,4 mg/kg m.c. W oparciu o pomiary wykonywane po upływie 2, 6 i 10 godzin od podania wykazano, że w grupach Resflor 1X i 2X działanie przeciwgorączkowe było silniejsze niż w grupie Nuflo[®] ($P < 0,0001$), co było widoczne jeszcze 24 godziny po podaniu leku ($P < 0,02$). W którymkolwiek punkcie pomiarowym pomiędzy grupami Resflor[®] 1X i 2X nie zaobserwowano jakiegokolwiek różnicy w działaniu przeciwgorączkowym leku.

Całkowity obszar zagęszczonej tkanki płucnej (%) wyliczono dla każdego zwierzęcia według poniższego, opublikowanego w innych pracach⁹, równania:

$$\text{Zagęszczona tkana płucna ogółem (\%)} = 10\% \times (\text{część doczaszkowa płata doczaszkowego płuca lewego} + \text{część doogonowa płata doczaszkowego płuca lewego}) / 2 + 27\% \times \text{płat doogonowy lewy} + 5\% \times \text{płat dodatkowy} + 30\% \times \text{płat doogonowy prawy} + 8\% \times \text{płat środkowy płuca prawego} + 20\% \times (\text{część doczaszkowa płata doczaszkowego płuca prawego} + \text{część doogonowa płata doczaszkowego płuca prawego}) / 2$$

W grupach doświadczalnych w 6 dniu badania odsetek zagęszczonej tkanki płucnej wynosił przeciętnie 22,8% w grupie Nuflo[®], 14,4% w grupie Resflor[®] 1X, a 13,5% w grupie Resflor[®] 2X (**Rycina 17**). W dwóch grupach zwierząt, które otrzymały preparat Resflor[®], całkowita powierzchnia zagęszczonej tkanki płucnej była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do grupy Nuflo[®], natomiast różnica pomiędzy dwoma grupami Resflor[®] nie była istotna statystycznie.



Rycina 17

Wpływ leczenia na stopień zagęszczenia tkanki płucnej oceniany w 6 dniu badania. U zwierząt z grupy Resflor® 1X lub 2X stopień zagęszczenia tkanki płucnej był mniejszy niż u bydła leczonego preparatem Nuflo®. Pomiedzy obiema grupami Resflor® nie zaobserwowano jakichkolwiek różnic względem powierzchni zagęszczonej tkanki płucnej.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że z uwagi na brak statystycznych różnic pomiędzy dwoma preparatami nie obserwuje się korzystnego działania związanego ze zwiększeniem zawartości fluniksyny w preparacie Resflor® ponad dawkę 2,2 mg/kg masy ciała. W obu grupach doświadczalnych, którym podano preparat Resflor®, odnotowany spadek ciepłoty wewnętrznej i zmniejszenie nasilenia zmian w płucach przewyższały wartości tych parametrów oznaczone w grupie Nuflo®.

***Mannheimia haemolytica* – doświadczalny model zakażenia**

Czterdzieści dwa (42) klinicznie zdrowe cielęta zakażono patogenem przyczyniającym się do rozwoju zespołu BRD i w pierwszym dniu badania (przed zastosowaniem leczenia) losowo, w oparciu o mierzoną rektalnie ciepłotę wewnętrzną, przypisano do jednej z dwóch grup doświadczalnych:

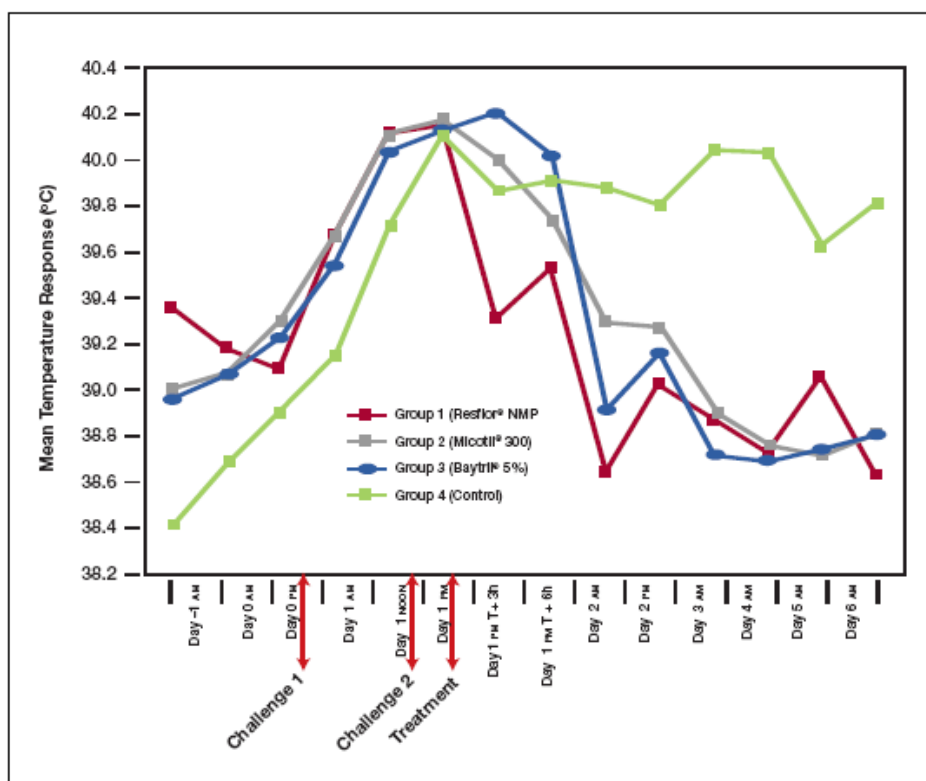
- Grupa 1: n = 12, Resflor®, 40 mg florfenikolu/kg, jednokrotnie, s.c.
- Grupa 2: n = 12, Micotil® 300, 10 mg tylmikozyzny/kg, jednokrotnie, s.c.
- Grupa 3: n = 12, Baytril® 5%, 5 mg enrofloksacyny/kg/dzień, przez 33 dni, s.c.
- Grupa 4: n = 6, nieleczona

W badaniu wykorzystano patogenny szczep *Mennheimia haemolytica* wyizolowany od bydła z zapaleniem płuc, który określono jako wrażliwy w warunkach in vitro na florfenikol, tylmikozynę

oraz enrofloksacynę (CEBIPHAR Ve3858, typ A1). Po południu w dniu 0 zwierzętom wprowadzono dotchawiczo 10 ml inokulat zawierający około 10^8 JTK/ml, a następnie powtórnie zakażono drogą donosową w południe pierwszego dnia badania.

Leczenie wprowadzono po podaniu drugiego inokulatu wówczas, gdy co najmniej 50% zwierząt przejawiało objawy ze strony układu oddechowego i ciepotę wewnętrzną przekraczającą $39,9^{\circ}\text{C}$. W opisywanym modelu badania u większości cieląt gorączkę i objawy ze strony układu oddechowego obserwowano począwszy od godzin rannych pierwszego dnia doświadczenia.

Zmiany ciepoty wewnętrznej przedstawione są na **Rycinie 18** oraz w **Tabelach 4 i 5**. Po upływie około 3 godzin od zastosowania leczenia (dzień pierwszy + 3 godziny) u cieląt, które otrzymały preparat Resflor[®] średnia temperatura rektalna była znacząco niższa w porównaniu do grup Miccotil[®], Baytril[®] lub nieleczonej, natomiast po upływie niespełna 6 godzin od podania leku przeciętna temperatura rektalna u cieląt z grupy Resflor[®] była wyraźnie niższa niż u zwierząt, które otrzymały preparat Baytril[®]. Rankiem kolejnego dnia (dzień 2, rano), średnia temperatura rektalna u cieląt z grupy Resflor[®] była istotnie niższa w porównaniu do grup Miccotil[®] lub nieleczonej.



Rycina 18
Przeciętny spadek temperatury w 4 grupach cieląt z wywołanym sztucznie zapaleniem płuc. W ciągu pierwszych kilku godzin od podaniu, leku silniejsze działanie przeciwgorączkowe obserwowano u cieląt, które otrzymały preparat Resflor[®] (patrz: Tabela 4).

Tabela 4. Porównanie temperatury rektalnej pomiędzy badanymi grupami w doświadczalnym modelu zakażenia *Mannheimia haemolytica* w okresie od 1 do 3 dnia badania

	Day 1 PM +3 hrs			Day 1 PM +6 hrs			Day 2 AM			Day 2 PM			Day 3		
	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril
Micotil®	**			ns			*			ns			ns		
Baytril®	**	ns		**	ns		ns	ns		ns	ns		ns	ns	
Untreated	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	*	ns	*	**	**	**

ns = no statistical difference
 *P ≤ 0.05
 **P ≤ 0.01

Day 1 PM +3 hrs = dzień 1 po południu + 3 godz. Day 2 AM = dzień 2, rano Day 2 PM = dzień 2, po południu
 Untreated = grupa nieleczonej ns = brak różnicy statystycznej

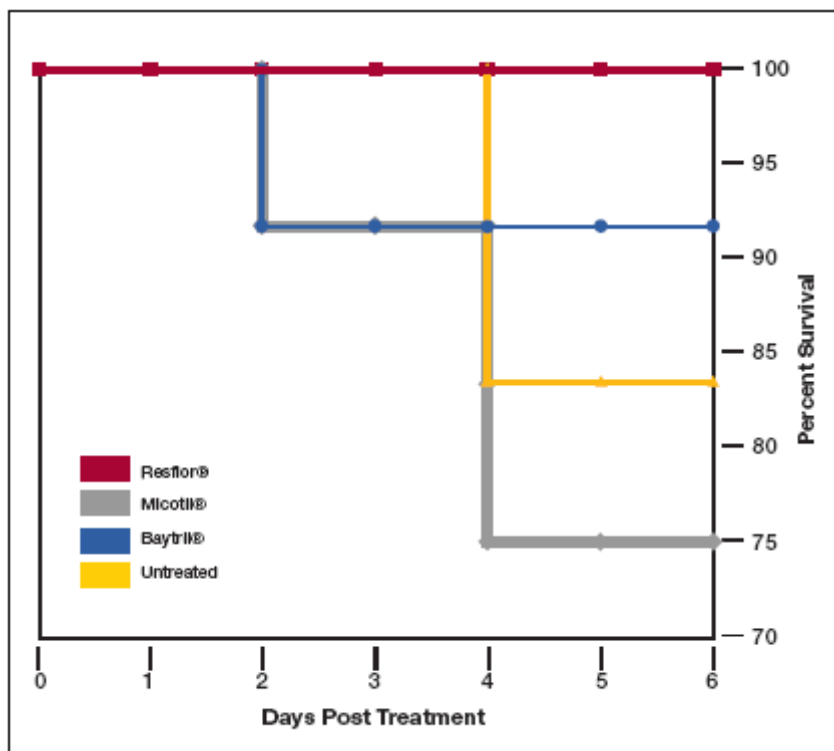
Tabela 5. Porównanie temperatury rektalnej pomiędzy badanymi grupami w doświadczalnym modelu zakażenia *Mannheimia haemolytica* w okresie od 4 do 6 dnia badania.

	Day 4			Day 5			Day 6		
	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril	Resflor	Micotil	Baytril
Micotil®	ns			ns			ns		
Baytril®	ns	ns		ns	ns		ns	ns	
Untreated	**	**	**	ns	*	**	**	*	**

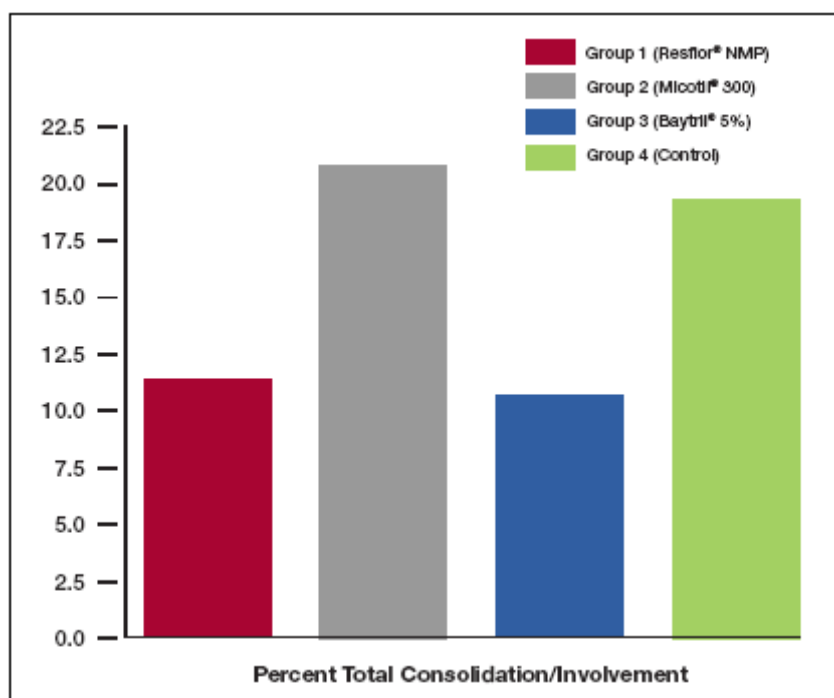
ns = no statistical difference
 *P ≤ 0.05
 **P ≤ 0.01

Untreated = grupa nieleczonej ns = brak różnicy statystycznej

W opisywanym modelu badania w grupie zwierząt, które otrzymały preparat Resflor®, nie odnotowano żadnego upadku, natomiast 3 w grupie Micotil® i po jednym w grupach Baytril® oraz nieleczonej (**Rycina 19**). Stopień zagęszczenia tkanki płucnej, w którym różnice nie były statystycznie istotne, był jednak liczbowo niższy u cieląt leczonych preparatami Resflor® i Baytril® w porównaniu do grup Micotil® lub nieleczonej (**Rycina 20**).



Rycina 19
Zależność przeżywalność cieląt – czas w 4 grupach doświadczalnych sztucznie zakażonych *Mannheimia haemolytica*.



Rycina 20
Średnia powierzchnia zagęszczonej tkanki płucnej w 4 grupach doświadczalnych sztucznie zakażonych *Mannheimia haemolytica*.

TERENOWE PRÓBY KLINICZNE – STANY ZJEDNOCZONE I EUROPA

Skuteczność preparatu Resflor[®] w warunkach terenowych oceniano w 7 stadach bydła mięsnego: 5 na obszarze Stanów Zjednoczonych, a 2 zlokalizowanych we Francji. W Stanach Zjednoczonych ocena skuteczności ograniczała się do oznaczenia działania przeciwgorączkowego. Z uwagi na podobieństwo parametrów farmakokinetycznych florfenikolu pomiędzy preparatami Resflor[®] i Nuflo[®], w badaniu oceniano jedynie skuteczność fluniksyny. We Francji natomiast skuteczność preparatu Resflor[®] oceniano całościowo jako rutynową metodę leczenia zespołu oddechowego.

Próby kliniczne przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych

Próby kliniczne przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych oparte były o ślepy, kontrolowany grupą porównawczą dodatnią i ujemną, prowadzony w wielu ośrodkach model doświadczalny. Do badania klasyfikowano wyłącznie cielęta przejawiające ostre objawy kliniczne zespołu BRD, tj. osowiałość, nieprawidłowe parametry oddechowe oraz gorączkę ($\geq 40,3^{\circ}\text{C}$). Cielęta wykazujące objawy kliniczne współistniejącej choroby ogólnej innej niż zespół oddechowy, konające bądź przejawiające zaburzenia fizykalne i/lub behawioralne potencjalnie zakłócające przebieg badania zostały wykluczone z doświadczenia. Po zakwalifikowaniu do badania, cielęta losowo przypisano w proporcji 1:1:1 do jednej z 3 poniższych grup doświadczalnych:

- Leczenie 1: Roztwór fizjologiczny
- Leczenie 2: Nuflo[®]
- Leczenie 3: Resflor[®]

U każdego cielęcia zastosowano przypisane leczenie podając jednokrotnie dawkę 20 ml/150 kg m.c., drogą iniekcji podskórnej w okolicę szyi. Podawana w jednym miejscu objętość wynosiła maksymalnie 10 ml. Po podaniu leku cielęta przemieszano w kojcach i każdy kojec był reprezentatywny dla wszystkich grup doświadczalnych.

Pomiar temperatury rektalnej wykonano po upływie 6 godzin (± 1 godzina) od podaniu leku. Wszystkie osoby dokonujące pomiarów ciepłoty wewnętrznej nie posiadały informacji o rodzaju zastosowanego leczenia ani też nie uczestniczyły bądź były obecne w trakcie podawania leku. Za kryterium ukończenia badania przez każde zwierzę przyjęto dokonanie pomiaru ciepłoty wewnętrznej zastosowaniu leczenia.

Populacja bydła mięsnego objętego badaniem była różnorodna i obejmowała cielęta czystych ras oraz krzyżówek, pochodzące z północnej oraz południowo-wschodniej części Stanów Zjednoczonych. Wśród typowych reprezentowanych w badaniu ras należy wymienić następujące: Angus, Hereford, Brahman, Simmental oraz Charolais. Populacja doświadczalna obejmowała zarówno samce, jak i samice, w proporcji 2:3.

Badaniem objęto łącznie 525 cieląt, które poddano leczeniu. Po wykluczeniu 14 zwierząt z powodu naruszenia kryteriów doświadczalnych, skuteczność leczenia oceniano u 511 cieląt (**Tabela 6**), natomiast bezpieczeństwo terapii analizowano uwzględniając wszystkie 525 zwierząt. Najważniejszą zmienną w opisywanym badaniu była mierzona rektalnie ciepłota wewnętrzna. Temperaturę rektalną mierzono u każdego zwierzęcia przed leczeniem oraz po upływie 6 godzin (± 1 godzina) od podania leku. Oceniano ponadto bezpieczeństwo stosowania terapii obserwując i odnotowując działania niepożądane od momentu podania leku do zakończenia badania po upływie 6 godzin.

Tabela 6. Lokalizacja obiektów badawczych oraz klasyfikacja grup doświadczalnych w klinicznych próbach terenowych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych

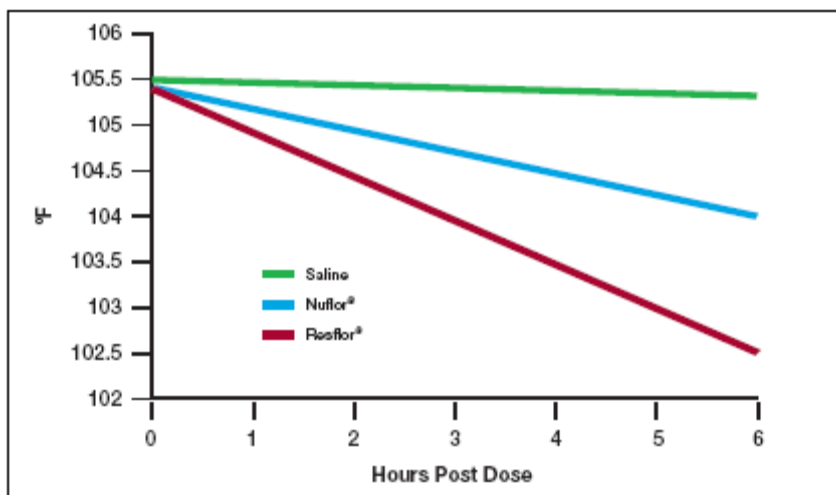
Site	Treatment					
	Saline		Nuflo [®]		Resflo [®]	
	No. Treated	No. Eligible*	No. Treated	No. Eligible*	No. Treated	No. Eligible*
Texas (Site 1)	23	23	22	22	22	22
Idaho	18	18	18	18	18	18
Nebraska	47	45	46	45	47	47
Texas (Site 2)	31	28	32	28	31	28
Colorado	56	56	57	56	57	57
TOTAL	175	170	175	169	175	172

*No. eligible - numbers of calves qualifying for the efficacy portion of the statistical analysis

Site – lokalizacja Treatment – schemat leczenia Saline – roztwór fizjologiczny No. Treated - liczba zwierząt leczonych No. Eligible* - liczba zwierząt zakwalifikowanych (Site 2) – obiekt 1 TOTAL - ogółem

*No. eligible = liczba cieląt uwzględnionych w etapie analizy statystycznej oceniającej skuteczność leczenia

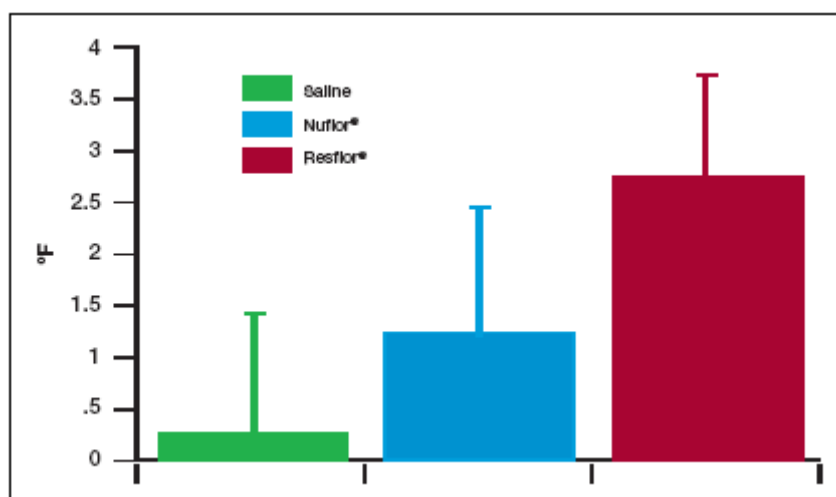
Kryteria doświadczalne zostały wypełnione w przypadku 511 cieląt, które uwzględniono w analizie statystycznej. W 6 godzinie badania przeciętna temperatura rektalna w grupie, która otrzymała roztwór fizjologiczny, wynosiła 40,7^oC, w grupie Nuflo[®] 40,0^oC, natomiast u zwierząt, którym podano Resflo[®], 39,2^oC (**Rycina 21**). W obu grupach doświadczalnych Nuflo[®] i Resflo[®] temperatura rektalna była statystycznie istotnie niższa ($P < 0,0001$ dla obu grup) w porównaniu do grupy, która otrzymała roztwór fizjologiczny, a w grupie Resflo[®] statystycznie istotnie niższa ($P < 0,0001$) niż w grupie Nuflo[®].



Rycina 21

Wpływ leczenia na średnią temperaturę rektalną u bydła z zespołem BRD w badaniach prowadzonych w Stanach zjednoczonych.

Spadek temperatury w stosunku do wartości wyjściowej wynosił średnio $0,15^{\circ}\text{C}$ w grupie zwierząt, którym podano roztwór fizjologiczny, w grupie Nufloř® $0,68^{\circ}\text{C}$, natomiast $1,55^{\circ}\text{C}$ w grupie Resfloř®. W tej ostatniej 6 godzin po zastosowaniu leczenia odnotowano najwyższy spadek temperatury w odniesieniu do wartości wyjściowej (**Rycina 22**). W grupach Nufloř® i Resfloř® spadek ciepłoty wewnętrznej był statystycznie wyższy niż u zwierząt, które otrzymały roztwór fizjologiczny ($P=0,0007$ dla grupy Nufloř® i $P<0,0001$ dla grupy Resfloř®), zaś w grupie Resfloř® spadek ten był statystycznie większy niż w grupie Nufloř® ($P<0,0001$).



Rycina 22

Wpływ leczenia na spadek (\pm OS) temperatury rektalnej u bydła z zespołem BRD w badaniach prowadzonych w Stanach zjednoczonych.

W trakcie badania u żadnego zwierzęcia nie zaobserwowano jakichkolwiek działań niepożądanych. Badane produkty i preparat kontrolny były dobrze tolerowane przez wszystkie objęte badaniem cielęta.

Opisywane kluczowe badanie terenowe przeprowadzono celem ustalenia, czy skojarzone podawanie cielętom z zespołem BRD florfenikolu i megluminianu fluniksyny (Resflor[®]) w jednej podskórnej iniekcji przejawia skuteczniejsze działanie przeciwgorączkowe niż rutynowo stosowania antybiotykoterapia (Nuflor[®]) oraz roztwór fizjologiczny (kontrola ujemna).

Wyniki oraz analiza danych potwierdzają, że zastosowanie preparatu Resflor[®] prowadzi w ciągu 6 godzin (\pm 1 godzina) od podania leku do spadku średniej temperatury rektalnej o co najmniej 1,11⁰C, a tenże spadek ciepłoty wewnętrznej jest statystycznie istotny w porównaniu do grup, w których zastosowano preparat Nuflor[®] ($P < 0,0001$) oraz roztwór fizjologiczny ($P < 0,0001$).

Próby kliniczne przeprowadzone w Europie

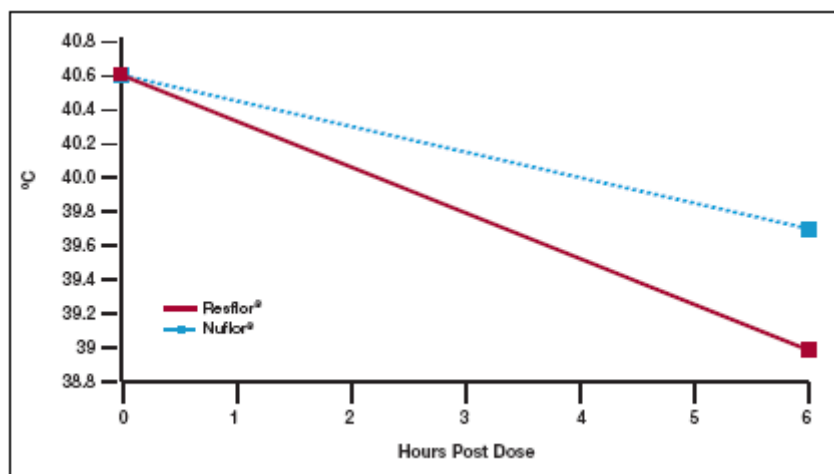
W badaniach przeprowadzonych we Francji wykorzystano ślepy, kontrolowany grupą dodatnią, prowadzony w wielu ośrodkach model doświadczalny. Cielętom przejawiającym objawy kliniczne w postaci osowiałości (ocena \geq umiarkowana osowiałość), zaburzenia czynności układu oddechowego (tj. co najmniej dwa z następujących objawów: zwiększona częstość oddechów, duszność, kaszel, śluzowo-ropny wypływ z nosa) oraz gorączki przekraczającej 40,3⁰C w sposób losowy przypisano leczenie z zastosowaniem preparatu Resflor[®] bądź Nuflor[®]. Z badania wykluczono zwierzęta konające lub wykazujące chorobę ogólną, inną niż zespół BRD. Celem zapewnienia obiektywności badania, oba testowane produkty opakowane były w identyczne fiolki, oznaczone jedynie kodem przypisanym leczeniu, który nie był znany żadnym uczestniczącym w badaniu pracownikom farm.

Przed zastosowaniem leczenia oraz w przypadku jego niepowodzenia, celem wykonania badań hodowlanych i lekowrażliwości mikroorganizmów, od zwierząt pobierano wymaz z części nosowej gardła. U każdego cielęcia zastosowano przypisane wcześniej leczenie, podając jednokrotnie dawkę 20 ml/150 kg m.c. drogą iniekcji podskórnej w okolicę szyi. Podawana w jedno miejsce objętość leku nie przekraczała 10 ml. Po zastosowaniu leczenia cielęta przemieszczano w kojcach i każdy kojec był reprezentatywny dla wszystkich grup doświadczalnych. W dniu 0, po upływie 5 do 8 godzin od podania leku, dokonano pomiaru ciepłoty wewnętrznej, a następnie począwszy od pierwszego aż do 10 dnia prowadzono obserwacje poszczególnych zwierząt w kojcach każdego dnia o jednakowej porze. Objawy kliniczne, tj. osowiałość i zaburzenia oddychania, oceniano przed leczeniem w dniu 0, pięć do 8 godzin (docelowo 6 godzin) po podaniu leku i raz dziennie, rano, od pierwszego do 10 dnia badania. Począwszy od 4 dnia i aż do 10, stan kliniczny cieląt oceniano codziennie podczas „obserwacji w kojcach”, pod

kątem objawów wskazujących na pogłębiający się proces chorobowy. Pomiar temperatury rektalnej wykonywano jedynie u zwierząt osowiałych (\geq nieznaczna osowiałość) i/lub przejawiających zaburzenia czynności oddechowej (co najmniej dwa z wyżej wymienionych objawów ze strony układu oddechowego). Z grupy takich cieląt zwierzęta o ciepocie wewnętrznej przekraczającej $40,0^{\circ}\text{C}$ sklasyfikowano jako „niepowodzenie leczenia”, wykluczono z badania i poddano rutynowemu leczeniu zespołu oddechowego, natomiast osobniki, których temperatura nie przekraczała $40,0^{\circ}\text{C}$, pozostawiono w badaniu i ponownie wprowadzono do kojców.

Doświadczenie przeprowadzono na 2 farmach zlokalizowanych we Francji: w Saint Martin sur le Pré oraz Devillac. Badaniem objęto głównie byczki ras Blonde d'Aquitaine oraz Charolais, łącznie 211 sztuk, z których 107 zaliczono do grupy Nuflo[®], a 104 do grupy Resflo[®].

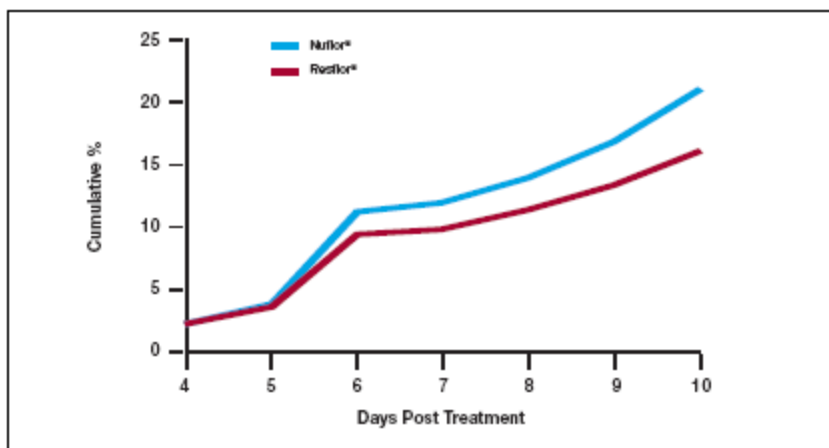
Główną zmienną w opisywanym badaniu była mierzona rektalnie ciepota wewnętrzna. U każdego zwierzęcia pomiaru dokonano przed leczeniem oraz 6 godzin (od 5 do 8 godzin) po podaniu leku. Wyjściowa ciepota wewnętrzna (czas 0) nie była istotnie różna pomiędzy cielętami z grup Nuflo[®] i Resflo[®], natomiast 6 godzin po podaniu leku temperatura rektalna w tych grupach była znacząco ($P < 0,001$) niższa (**Rycina 23**). Spadek temperatury był wyższy ($P < 0,001$) w grupie Resflo[®] w porównaniu do grupy Nuflo[®].



Rycina 23

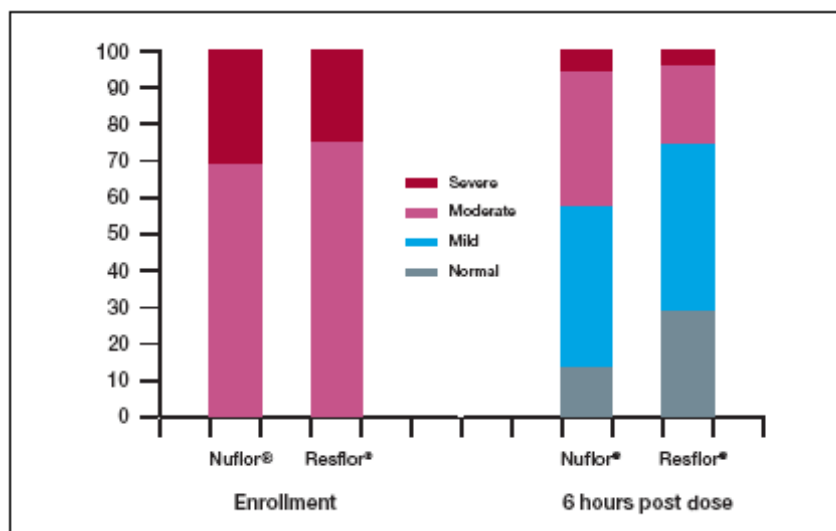
Wpływ leczenia na średnią temperaturę rektalną. Preparaty Nuflo[®] i Resflo[®] obniżają mierzoną rektalnie ciepotę wewnętrzną ($P < 0,001$), a spadek temperatury był wyższy u zwierząt leczonych preparatem Resflo[®].

W obu grupach liczba przypadków niepowodzenia leczenia była zbliżona (**Rycina 24**), natomiast preparat Resflo[®] znacznie szybciej niż Nuflo[®] ($P < 0,01$ dla obu parametrów oznaczanych 6 godzin po zastosowaniu leczenia) zmniejszył osowiałość zwierząt (**Ryciny 25 i 26**) oraz złagodził objawy ze strony układu oddechowego (**Ryciny 27 i 28**). W kolejnych punktach czasowych różnice były mniej znaczące. W żadnej z grup nie odnotowano upadków.



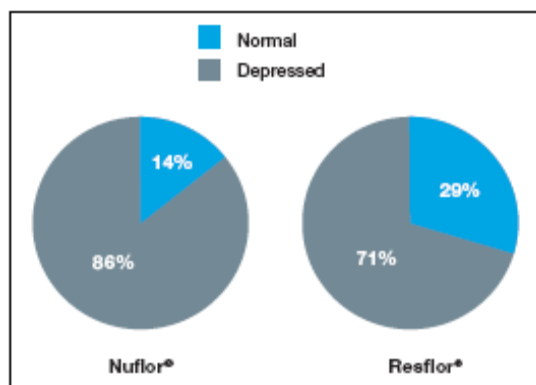
Rycina 24

Łączna liczba przypadków niepowodzenia leczenia. Pomiędzy grupami Nuflo® i Resflo® nie odnotowano jakichkolwiek różnic.



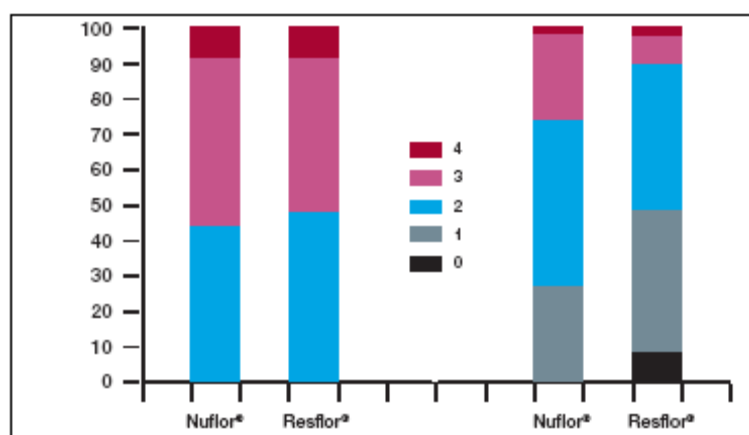
Rycina 25

Wpływ leczenia na osowiałość zwierząt oceniany 6 godzin po podaniu leku.



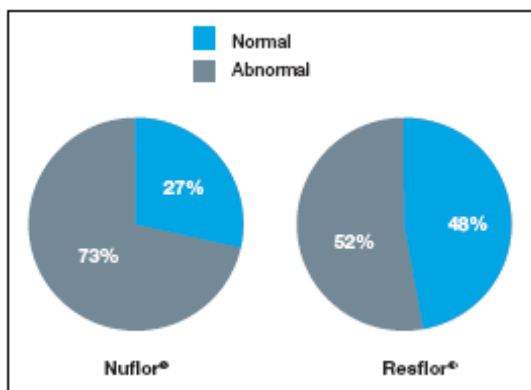
Rycina 26

Wpływ leczenia na częstotliwość pojawiania się osowiałości i apatii zwierząt oceniany 6 godzin po podaniu leku.



Rycina 27

Wpływ leczenia na ocenę czynności oddechowych (liczba następujących objawów klinicznych: wzrost częstości oddechów, duszność, kaszel i śluzowo-ropny wypływ z nosa).



Rycina 28

Wpływ leczenia na przebieg oddychania oceniany 6 godzin po podaniu leku.

W oparciu o wyniki badania metodą dyfuzyjną według Kirby-Bauera oraz oznaczanie wartości MIC wszystkie wyizolowane patogeny uznano za wrażliwe na działanie florfenikolu (Tabela 7).

Tabela 7. Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) drobnoustrojów wyizolowanych od bydła z wymazów pobranych z części nosowej gardła*

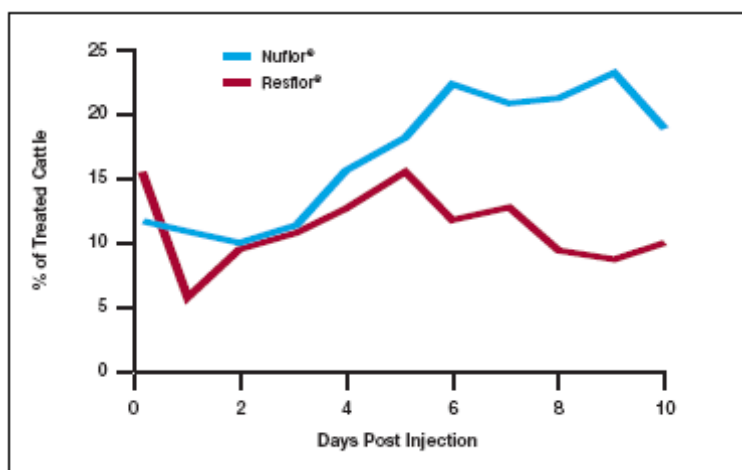
Dilution	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						No. Isolates	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	0.12	0.25	0.5	1	2	4			
Isolate									
<i>Mannheimia haemolytica</i>		5	128	13			146	0.5	0.5
<i>Pasteurella multocida</i>	2	42	6				50	0.25	0.5
<i>Haemophilus somnus</i>	2	14					16	0.25	0.25

*Cattle were swabbed at enrollment and at time of treatment failure (if it occurred).
Based on CLSI breakpoints, all isolates were sensitive to florfenicol.

No. Isolates – liczba izolatów Dilution - rozcieńczenie Isolate – izolat

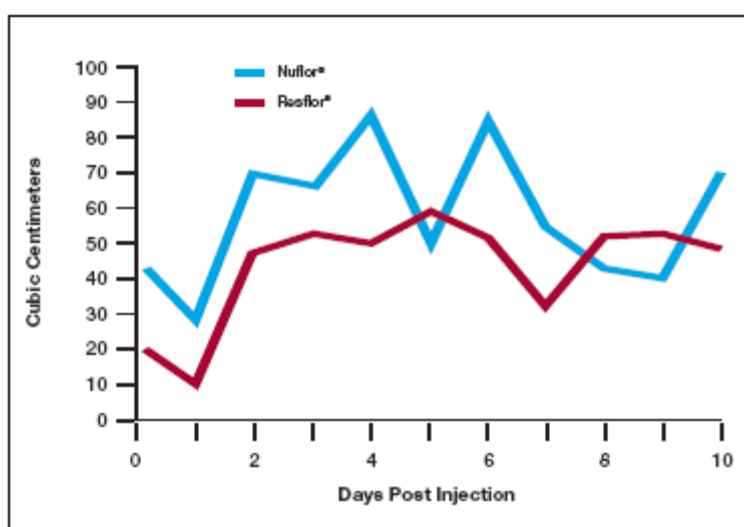
* wymazy pobierano w momencie kwalifikacji do badania oraz w przypadku niepowodzenia leczenia (jeśli wystąpiło) w oparciu o wartości graniczne zgodne z kryteriami NCCLS. Wszystkie izolaty uznano za wrażliwe na florfenikol.

Preparat Resflo® był dobrze tolerowany przez cielęta z zespołem BRD. W badaniach terenowych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych czy Francji nie zaobserwowano jakichkolwiek działań niepożądanych związanych ze stosowanym leczeniem. W próbach klinicznych przeprowadzonych we Francji codziennie oceniano ponadto reakcję w miejscu podania – w grupie, która otrzymała preparat Resflo® odczyn tkankowy (obrzęk) odnotowano u mniejszej liczby zwierząt (Rycina 29). Wśród cieląt z obrzękiem w miejscu iniekcji, nasilenie odczynu tkankowego było mniejsze u osobników, które otrzymały preparat Resflo® (Rycina 30).



Rycina 29

Odsetek zwierząt z wyraźnym odczynem tkankowym po podaniu leku.



Rycina 30

Nasilenie zmiany w miejscu iniekcji oceniano u każdego cielęcia z wyraźnym obrzmieniem, mierząc (w cm) długość, szerokość i głębokość zmienionej tkanki. Objętość leku oszacowano matematycznie wykorzystując poniższy wzór: objętość = π (długość x szerokość x głębokość)/6). Podczas 4 i 6 dnia badania pomiędzy grupami nie odnotowano statystycznie istotnych różnic (P= odpowiednio 0,08 i 0,07, w

teście dwustronnym).

PODSUMOWANIE

Obecnie dostępny jest już preparat o „wartościowej” z farmakologicznego punktu widzenia formule, zawierający dwie powszechnie wykorzystywane w lecznictwie weterynaryjnym substancje czynne. Preparat Resflor® jest połączeniem fluniksyny, tj. NLPZ, i długo działającego leku przeciwbakteryjnego, florfenikolu, w dobrze tolerowanym roztworze. NLPZ już w ciągu pierwszych kilku godzin od podania znacząco łagodzi objawy kliniczne zespołu BRD, zanim jeszcze lek przeciwbakteryjny osiągnie pełne działanie. Ponadto skojarzone stosowanie tych dwóch substancji czynnych ogranicza stopień zagęszczenia tkanki w zmienionych zapalnie płucach u bydła oraz poprawia parametry farmakokinetyczne składnika przeciwbakteryjnego.

PIŚMIENICTWO

1. Lockwood PW, de Haas V, Katz T. Flunixin meglumine as an adjunct to antibacterial therapy: Efficacy in the treatment of bovine respiratory disease complex under typical North American feedlot conditions. Proceedings of a symposium held in conjunction with the XIX World Buiatrics Congress. *Bovine Respiratory Disease – Total Health Management*. Edinburgh, Scotland. 1996.
2. Doherty ML, Healy AM, Sherlock M, et al. Combined oxytetracycline-flunixin therapy in field cases of acute bovine respiratory disease. *Irish Vet J* 2001;4(5):232-238.
3. Lockwood PW, Johnson JC, Katz TL. Clinical efficacy of flunixin, carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *Vet Rec* 2003;152(13):392-394.
4. Wittum TE, Woollen NE, Perino LJ, Littledike ET. Relationships among treatment for respiratory tract disease, pulmonary lesions evident at slaughter, and rate of weight gain in feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209(4):814-818.
5. US FDA Center for Veterinary Medicine Bioequivalence Guidance (Final) October 9, 2002.
6. Varma KJ: Microbiology, pharmacokinetic disposition and safety of florfenicol in cattle, in Proceedings of a program held on August 30, 1994 in association with the XVIII World Buiatrics Congress. International symposium on Bovine Respiratory Disease – New Therapeutic Advances. Toulouse, France, 1994, pp 18-24.
7. Varma KJ, Cosgrove SB: The practical use of in vitro testing and pharmacokinetics in rational selection of an antibiotic. Proceedings of a symposium held in conjunction with the XIX World Buiatrics Congress. *Bovine Respiratory Disease – Total Health Management*. Edinburgh, Scotland. 1996, pp 40–44.
8. De Craene BA, Deprez P, et al. Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997;41(9):1991-1995.
9. Andrews JA. PhD Thesis/Dissertation, Michigan State University, 1986.