

Антибактериална активност на Veraflox (прадофлоксацин) орална суспензия *in vitro* и приложение за терапия на инфекции при папагали

*Теодора П. Попова¹, **Гълъбин Младенов²

¹Факултет по ветеринарна медицина, Лесотехнически университет, – София

²„Младенови Вет ООД”, ж. к. „Надежда” – 1, бул. „Хан Кубрат”, бл. 101, – София 1220,
България,:

*E-mail: dr_tpopova@abv.bg

**E-mail: onib@abv.bg

Резюме

Извършени са микробиологични изследвания на материали от 217 папагала с различни инфекции, които показват значителен превес на стафилококовите заболявания (39,7% от изолатите) при тези птици, следвани от стрептококовите (33,7%). Изолираните Грам-отрицателни бактерии (17,4%) и гъбите (9,2%) са по-малко. Водеща е ролята на *S. aureus* като причинител на инфекции при папагалите, а от Грам-отрицателни видове – *Klebsiella* spp. (при 8,7% от изследваните пациенти), *E. coli* и *Moraxella catarrhalis*.

Основната част (95,4%) от изолираните 197 бактериални щама от 217 папагала показват чувствителност *in vitro* към Veraflox (суспензия за перорално приложение, съдържаща прадофлоксацин), определена по класическия дисков агар-гел дифузионен метод. Резистентност е отчетена само при отделни стафилококи и ентерококи. Всички пациенти, третирани с него след положителен резултат от антибиотикограмата, са трайно излекувани (94,7%), с изключение на 10 от птиците (5,3%), пристигнали за преглед и лечение в много тежко състояние. Установено е, че Veraflox орална суспензия е отлично средство за лекуване на различни инфекции при папагали. Успешно е определена дозата (15 mg/kg ж. т.) и кратността на пероралното му приемане (24 h), при която настъпва антимикробен ефект, без да има неблагоприятни странични ефекти за пациента. Veraflox се прилага за пръв път в нашата страна и в света за терапия на папагали с различни инфекции.

Извършено е определяне на минималните потискащи концентрации (МПК) за прецизна оценка на антибактериалния ефект на Veraflox спрямо *S. aureus* и *E. coli*. Изследваните бактериални щамове показват висока чувствителност към прадофлоксацин, както и към контролния хинолон енрофлоксацин, макар че инхибиторният ефект на енрофлоксацина е по-висок. Чувствителността на изпитаните щамове на *S. aureus* към прадофлоксацина е по-ниска отколкото тази на щамове на *E. coli*. Средните стойности на МПК₅₀ на този хинолон за Грам-положителните бактерии *S. aureus* ($0,25 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$) са по-високи от тези за Грам-отрицателните *E. coli* ($0,18 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$), като разликите са достоверни ($P < 0,05$). Резултатите, получени при определяне на чувствителността към енрофлоксацина, са противоположни. Развитието на изпитаните щамове на *S. aureus* се потиска от значително по-ниски концентрации от този хинолон в сравнение с тези за *E. coli*. Отчетените средни стойности на МПК₅₀ за *S. aureus* са $0,018 \pm 0,008 \mu\text{g/ml}$, докато тези за *E. coli* – $0,044 \pm 0,015 \mu\text{g/ml}$.

Ключови думи: папагали, инфекции, Veraflox, прадофлоксацин, енрофлоксацин, антибактериална активност

Antibacterial activity of Veraflox (pradofloxacin) oral suspension in vitro and application for the treatment of infections in parrots

*Teodora P. Popova¹, **Galabin Mladenov²

¹University of Forestry, Faculty of Veterinary Medicine, Kliment Ohridski Blvd. 10, Sofia 1756, Bulgaria

²"Mladenovi Vet Ltd.", Nadezhda - 1, Han Kubrat Blvd., Bl. 101, Sofia 1220, Bulgaria,

*E-mail: dr_tpopova@abv.bg

**E-mail: onib@abv.bg

Citation: Popova, T. P., & Mladenov, G. (2020). Antibacterial activity of Veraflox (pradofloxacin) oral suspension in vitro and application for the treatment of infections in parrots. *Zhivotnovadni Nauki*, 57(2), 53-64 (Bg).

Abstract

Microbiological studies on materials from 217 parrots with various infections have been performed that showed a significant prevalence of the staphylococcal diseases (39.7% of isolates) in these birds, followed by streptococcal ones (33.7%). The isolated Gram-negative bacteria (17.4%) and fungi (9.2%) were less. The role of *S. aureus* as an infectious agent in the parrots was leading, and from Gram-negative species – of *Klebsiella* spp. (in 8.7% of the patients studied), *E. coli* and *Moraxella catarrhalis*.

The major part (95.4%) of the isolated 197 bacterial strains of 217 parrots showed sensitivity in vitro to Veraflox (a suspension for oral administration containing pradofloxacin), determined by the classical disk agar-gel diffusion method. Resistance was only detected in single staphylococcal and enterococcal strains. All patients treated with it after a positive result of the antibiogram were permanently cured (94.7%), with the exception of 10 birds (5.3%) that came for examination and treatment in very serious condition. Veraflox oral suspension has been found to be an excellent mean for treating various parrot infections. The dose (15 mg/kg bw) and the frequency of oral administration (24 h) at which an antimicrobial effect occurs without any adverse side effects for the patient have been successfully determined. This is the first report for use of Veraflox in our country and in the world for the treatment of parrots with various infections.

Determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) was also performed to accurately assess the antibacterial effect of Veraflox against *S. aureus* and *E. coli*. The bacterial strains tested showed high sensitivity to pradofloxacin as well as to the control quinolone enrofloxacin, although the inhibitory effect of enrofloxacin was higher. The susceptibility of tested strains of *S. aureus* to pradofloxacin was lower than that of *E. coli* strains. The mean MIC₅₀ values of this quinolone for the Gram-positive bacteria *S. aureus* ($0.25 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$) were higher than those for the Gram-negative *E. coli* ($0.18 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$), with significant differences ($P < 0.05$). The results obtained when determining sensitivity to enrofloxacin were opposite. The development of the tested strains of *S. aureus* was suppressed by significantly lower concentrations of this quinolone than those for *E. coli*. The reported mean MIC₅₀ values for *S. aureus* were $0.018 \pm 0.008 \mu\text{g/ml}$, while those for *E. coli* – $0.044 \pm 0.015 \mu\text{g/ml}$.

Key words: parrots, infections, Veraflox, pradofloxacin, enrofloxacin, antibacterial activity

Въведение

Флуорохинолоните са едни от най-ефикасните синтетични антимикробни средства, които се използват в хуманната и във ветеринарната медицина от много години. Дори и днес, когато антибиотичната резистентност на бактериите е основен световен проблем, те са едни от най-надеждните лекарства за терапия на инфекции, причинявани от редица бактерии. Действието им е бактерицидно в много ниски концентрации, а поносимостта от организма – много добра. Първият флуорохинолон, разработен за ветеринарномедицинско приложение, е енрофлоксацинът (Pallo-Zimmerman et al., 2010). Други ветеринарни антимикробни средства от тази група са орбифлоксацин и марбофлоксацин. Прадофлоксацинът (Pradofloxacin) е нов флуорохинолон от трето поколение, предназначен за приложение във ветеринарномедицинската практика. Той е одобрен в Европа и Канада за терапия на бактериални инфекции при кучета и котки, а в САЩ – за лечение на такива инфекции при котки (Lees, 2013).

Докато спектърът на активност на флуорохинолоните от първо поколение е бил срещу представителите на сем. *Enterobacteriaceae*, представителите на второто поколение от тази група имат по-широк спектър, включително срещу много други Грам-отрицателни микроорганизми, някои Грам-положителни видове (бацили, коки, микобактерии) и вътреклетъчни бактерии (*Rickettsia* spp., *Mycoplasma* spp.). Флуорохинолоните от трето поколение показват засилена активност срещу Грам-положителни бактерии в сравнение с тези от първо и второ поколение и добър ефект срещу облигатни анаероби. Прадофлоксацинът от тази група е разработен изключително за употреба във ветеринарната медицина. Това е трето поколение флуорохинолон и се очаква да проявява повишен ефект срещу Грам-положителни организми и анаероби. Това отличава прадофлоксацина от флуорохинолоновите съединения от по-ранно поколение, използвани във ветеринарната медицина (Silley et al., 2007).

След перорално приложение максимални концентрации на прадофлоксацина в кръвната плазма се постигат за по-малко от 3,0 h, а крайният му полуживот е 5–10 h. Активността на прадофлоксацин, подобно на други флуорохинолони, е резултат от инхибирането на два бактериални ензима, участващи в процеса на репликация на ДНК – ДНК-гиразата (топоизомераза II) и топоизомеразата IV (Lees, 2013; Kizerwetter-Świda et al., 2016). Бактерицидното му действие е в зависимост от микробния вид и от приложената концентрация. Прадофлоксацинът има висока потентност (ниски стойности на МПК) в сравнение с флуорохинолоните от първо и второ поколение. Има съобщения за добра клинична ефикасност срещу чувствителни бактерии, когато се прилага препоръчителната дозировка. Неговият спектър на активност включва положителни и отрицателни по Грам микроорганизми, включително строги анаероби, *Mycoplasma* spp. и някои вътреклетъчни микроорганизми (*Rickettsia* spp. и *Mycobacterium* spp.). Клинични проучвания на прадофлоксацина в сравнение с други разрешени антимикробни лекарства показват или аналогична активност, или превъзходство на прадофлоксацин. Съобщават се данни, показващи клинично, а в някои случаи и бактериологично излекуване при котки (инфекции на рани, абсцеси, инфекции на горните дихателни пътища, конюнктивит, котешка инфекциозна анемия и инфекции на долните пикочни пътища), както и при кучета (за инфекции на рани, повърхностна и дълбока пиодермия, остри инфекции на пикочните пътища и допълващо лечение на инфекции на тъканите на венците и пародонта). При клинични дозови нива прадофлоксацинът се понася добре в предклинични проучвания и в клинични изпитвания (Silley et al., 2007; Govendir et al., 2011; Lees, 2013; Papich, 2016).

Целта на настоящата работа е да изследваме *in vitro* чувствителността на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, изолирани от папагали с различни инфекции към Veraflox (суспензия за перорално приложение, съдържаща прадофлоксацин), както и терапевтичния му ефект при лечение на папага-

ли. Също така си поставихме за задача да оценим *in vitro* степента на инхибиращия ефект на прадофлоксацин върху развитието на патогенни щамове на *Staphylococcus aureus* и *Esherichia coli*, изолирани от пациенти, както и върху референтни щамове.

Материали и методи

Птици

Микробиологични изследвания са извършени на материали от 217 папагала от различни видове, показващи признаци на различни инфекции. Използвани са гърлени секрети – 202 бр., раневи секрети – 3 бр., фекални проби – 3 бр., ексудат, кръв и вътрешни органи – по 1 бр., материали от кожа – 10 бр.

Изолиране

За изолиране на микроорганизми са правени посявки в елективни и селективни хранителни среди за бактерии от различни групи, както и за гъби. Те са култивирани при 37 °C и 28 °C за 24–72 h при аеробни условия.

Хранителни среди

Използвани са кръвен агар, агар на Mueller Hinton, Мак Конки, Колорекс ориентейшън агар и агар на Сабуро с хлорамфеникол (HiMeida Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai India).

Таксономично идентифициране

Таксономичното идентифициране на изолираните бактерии е извършено чрез микроскопско изследване на оцветени по Грам препарати, отчитане на културалните особености и биохимични показатели с помощта на полимикротестове (HiMeida Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai India). Изолирането и идентифицирането на бактериите е проведено в съответствие с Международния определител на Bergey (Holt et al., 1994), а на гъбите е осъществено съгласно Murray et al. (2003).

Микроорганизми

В изследванията за определяне на минималните потискащи концентрации на

Verafloх (Pradofloxacin) са изпитани чисти култури от 11 патогенни щамове: 6 щамове на *Staphylococcus aureus* и 5 – на *Esherichia coli*. Включени са и два контролни щамове – 1 на *S. aureus subsp. aureus* ATCC – 6538 (NBIMCC 3359) и 1 на *E. coli* ATCC – 8739 (NBIMCC 3397), получени от българската Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури – NBIMCC (the Bulgarian National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures).

Антимикробни средства

Изпитан е ефектът на Verafloх перорална суспензия, съдържаща *pradofloxacin* 25 mg/ml (Bayer Animal Health GmbH D-51368 Leverkusen, Германия), предназначена за кучета и котки с ексципиенти амберлит IRP 64, сорбинова киселина, аскорбинова киселина, ксантанова гума, пропилен гликол, овкусител ванилия и пречистена вода. Като контрола е използван *enrofloxacin* 5% инжективен воден разтвор (Biofloхavet, Биовет – Пещера). Разрежданията са приготвени със стерилен фосфатносолев буфер (PBS) с рН 7,2.

Определяне на чувствителността

Определяне на чувствителността на изолираните 197 бактериални щамове от изследваните 217 пациента към антимикробни средства е извършено посредством класическия агар-гел дифузионен метод на Bauer et al. (1966), предназначен за бързорастящи при аеробни условия микроби, на Mueller Hinton агар (Бул Био НЦЗПБ – София), с рН 7,2–7,4 и дебелина на слоя 4 mm. Химиотерапевтиците са прилагани под формата на дискове от стандартна хроматографска хартия с диаметър 6 mm, натоварени със стандартна концентрация за тази група средства (5 µg). Инокулацията на бактериалните суспензии е извършвана в доза 10⁶ клетки/ml. След 30-минутна адсорбция на микроорганизмите са поставяни дисковете върху агаровата повърхност. Дифузията за 40 min на стайна температура е последвана от култивиране при 35–37 °C за 18–24 часа. Отчитането на резултатите е осъществявано посредством измерване

на диаметрите на стерилните зони в милиметри, включително и диаметъра на диска с точност до 1 mm, с прозрачна линейка от външната страна на дъното на петрите. Като граница на зоната е отчитано пълното потискане на растежа. Измерваните зони на инхибиция са интерпретирани по тристепенната система за категоризиране на Bauer и Kirby. Съгласно NCCLS (1997, 1999) висока чувствителност на микроорганизмите е установявана при зони на потискане на растежа ≥ 21 mm, средна чувствителност – при зони с диаметър от 16 до 20 mm и резистентност – при зони ≤ 15 mm

Минималните потискащи концентрации

(МПК) са определяни по метода на двукратните серийни разреждания от 0,016 до 8 $\mu\text{g/ml}$ в агар на Mueller-Hinton (Бул Био НЦЗ-ПБ – София) с pH 7,2–7,4, описан от Ericsson & Sherris (1971). Бактериалните суспензии са нанасяни в доза 10^6 клетки/ml. След инкубиране при 35–37 °C за 18–24 часа е определян броят на развилите се колонии. Изчислени са минималните концентрации в $\mu\text{g/ml}$ на енрофлоксацина, предизвикващи намаление на броя на колонии на микроорганизмите с 50% и с 90% в сравнение с нетретираните контроли, както и диапазонът на потискане на растежа (Д) – минималните концентрации на химиотерапевтика, при които растежът на съответния микроорганизъм е потиснат напълно. Бактериите с $\text{МПК}_{90} \leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ са оценявани като чувствителни, а тези с

$\text{МПК}_{90} \geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ – като устойчиви (NCCLS, 1999).

Терапия

За лечение на бактериалните инфекции при папагалите изпитохме препарата Veraflox (Pradofloxacin) перорална суспензия (Bayer Animal Health GmbH D-51368 Leverkusen, Германия), предназначена за кучета и котки, в доза 15 mg/kg ж. т. веднъж на 24 часа.

Всички експерименти са извършени трикратно.

Статистическата обработка на резултатите е извършена по класическия метод на Стюдънт и Фишер.

Резултати

Обобщените резултати от извършените микробиологични изследвания на материали от папагали с признаци на инфекции са представени на таблица 1.

От данните в таблицата се вижда значителният превес на стафилококовите инфекции при папагалите от различни видове. Тези бактерии се оказват причинители на 39,7% от заболяванията при изследваните птици. Значителен дял имат и причинителите на стрептококови инфекции, които достигат 33,7% от изолатите. С по-малка роля в заболяемостта на папагалите се оказват Грам-отрицателните бактерии (17,4% от изолатите) и гъбите (9,2 %).

Таблица 1. Изолирани микроорганизми при микробиологичните изследвания на материали от 217 пациента

Table 1. Microorganisms isolated in microbiological studies of materials from 217 patients

Изолирани микроорганизми / Isolated microorganisms	Брой изолати / No of isolates	Процент / Percent
Стафилококи / Staphylococci	86	39,7
Стрептококи / Streptococci	73	33,7
Грам-отрицателни / Gram-negative	38	17,4
Гъби - Fungi	20	9,2
Общо изследвани / Total examined	217	100

На таблица 2 са представени данните за изолирани причинители на стафилококови инфекции в резултат на извършените микробиологични изследвания на материали от болни пациенти.

Вижда се, че ролята на *S. aureus* като причинител на стафилококоза при папагалите е водеща. Този вид е доказан при 25,3% от изследваните птици. Значителна е ролята и на *S. epidermidis*, както и на коагулаза положителния вид *S. intermedius*. По-рядко се изолират *S. gallinarum*, *S. capitis*, и *S. xylosum*.

Таблица 2. Изолирани стафилококи при микробиологичните изследвания на материали от 217 изследвани папагала

Table 2. Staphylococci isolated in microbiological testing of materials from 217 parrots examined

Изолиран вид / Isolated species	Брой изолати / No of isolates	Процент / Percent
<i>S. aureus</i>	55	25,3
<i>S. epidermidis</i>	21	9,7
<i>S. intermedius</i>	5	2,3
<i>S. gallinarum</i>	3	1,4
<i>S. capitis</i>	1	0,5
<i>S. xylosum</i>	1	0,5
Общо / Total	86	39,7

Таблица 3. Изолирани Грам-отрицателни бактерии при микробиологичните изследвания на материали от 217 папагала

Table 3. Gram-negative bacteria isolated in microbiological testing of materials from 217 parrots examined

Изолиран вид / Isolated species	Брой изолати / No of isolates	Процент / Percent
<i>E. coli</i>	9	4,1
<i>K. pneumoniae</i>	15	6,9
<i>K. oxytoca</i>	4	1,8
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10	4,6
Общо / Total	38	17,4

Видовото разпределение на изолираните Грам-отрицателни бактерии от папагали може да се види на таблица 3. Преобладават *Klebsiella* spp. (при 8,7% от изследваните пациенти) с превес на *K. pneumoniae*. На второ място по значение са *Moraxella catarrhalis* и *E. coli*.

Резултатите от микробиологичните изследвания на папагали, при които са изолирани и идентифицирани стрептококи, може да се видят на таблица 4.

От обобщените данни в таблицата прави впечатление високият брой на изолираните ентерококи, установени при 18% от всички изследвани птици. *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* също са често изолирани. Изолатите са предимно от едри видове папагали (Жако, Еклектус и др.) и по-малко – от средни и дребни.

Таблица 4. Изолирани стрептококи при микробиологичните изследвания на материали от 217 изследвани папагала

Table 4. Streptococci isolated in microbiological testing of materials from 217 parrots examined

Изолиран вид / Isolated species	Брой изолати / No of isolates	Процент / Percent
<i>S. pyogenes</i>	16	7,4
<i>S. pneumoniae</i>	18	8,3
<i>Enterococcus</i> spp.	39	18
Общо / Total	73	33,7

Таблица 5. Изолирани гъби при микробиологичните изследвания на материали от 217 папагала

Table 5. Fungi isolated in microbiological testing of materials from 217 parrots examined

Изолиран вид / Isolated species	Брой изолати / No of isolates	Процент / Percent
<i>Candida albicans</i>	12	5,5
<i>Aspergillus</i> spp.	8	3,4
Общо / Total	20	9,2

От гъбите най-често се установяват *Candida albicans* и по-рядко – *Aspergillus* spp. (таблица 5).

Резултатите от микробиологичните изследвания *in vitro* за чувствителност към Верафлоркс (прадофлорксацин) на изолираните 197 бактериални щамове от 217 пациента може да се видят на таблица 6.

От обобщените данни става ясно, че основната част (95,4%) от изолатите от всички установени групи бактерии показват чувствителност към този химиотерапевтик.

Резистентност е отчетена при единични щамове стафилококи и ентерококи.

Всички пациенти, третирани с този продукт след положителен резултат от антибиотикограмата, бяха трайно излекувани (94,7%), с изключение на 10 от птиците (5,3%), пристигнали за преглед и лечение в много тежко състояние.

Обобщените резултати, получени при определяне на минималните потискащи концентрации (МПК) на прадофлорксацина, са

Таблица 6. Чувствителност към Верафлоркс на изолираните бактерии при микробиологичните изследвания на материали от 217 папагала

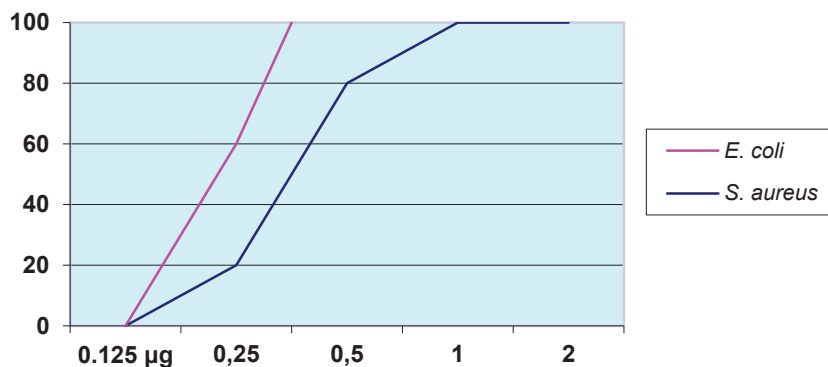
Table 6. Sensitivity to Veraflox of isolated bacteria in microbiological studies of 217 parrots

Изолирани бактерии / Isolated bacteria	Брой изолати / No of isolates	Чувствителни изолати / Sensitive isolates	
		Брой / No	Процент / %
<i>S. aureus</i>	55	51	92,7
<i>S. epidermidis</i>	21	20	95,2
<i>S. intermedius</i>	5	5	100
<i>S. gallinarum</i>	3	3	100
<i>S. capitis</i>	1	1	100
<i>S. xylosus</i>	1	1	100
<i>S. pyogenes</i>	16	16	100
<i>S. pneumoniae</i>	18	18	100
<i>Enterococcus</i> spp	39	35	89,7
<i>E. coli</i>	9	9	100
<i>K. pneumoniae</i>	15	15	100
<i>K. oxytoca</i>	4	4	100
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10	10	100
Общо / Total	197	188	95,4

Таблица 7. Средни стойности на минималните потискащи концентрации (МПК) на Pradofloxacin

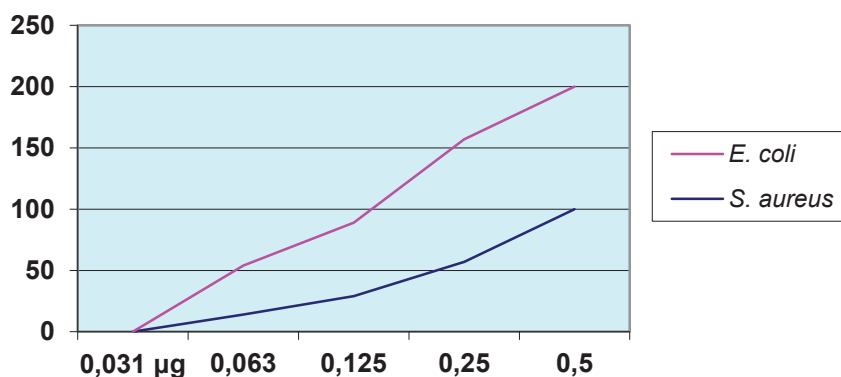
Table 7. Mean values of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of Pradofloxacin

Микроорганизми / Microorganisms	Щамове бр. / Strains No	МПК в µg/ml / MIC in µg/ml		
		МПК ₅₀ / MIC ₅₀	МПК ₉₀ / MIC ₉₀	Д / D
<i>E. coli</i>	5	0,18 ± 0,06	0,35 ± 0,12	0,70 ± 0,24
<i>S. aureus</i>	7	0,25 ± 0,12	0,50 ± 0,23	1,00 ± 0,46
Общо изследвани / Total examined	12	0,21 ± 0,04	0,43 ± 0,08	0,85 ± 0,15



Фиг. 1. Кумулативни криви на MPC₉₀ на Pradofloxacin за изследваните бактерии.

Fig. 1. Cumulative curves of MPC₉₀ of Pradofloxacin for the bacteria tested.



Фиг. 2. Кумулативни криви на MPC₉₀ на Enrofloxacin за изследваните бактерии.

Fig. 2. Cumulative curves of MPC₉₀ of Enrofloxacin for the bacteria tested.

отразени на табл. 7, а кумулативните криви на MPC₉₀ – на фигура 1.

Както се вижда от обобщените данни, чувствителността на изпитаните щамове на *E. coli* към прадофлораксина е по-висока отколкото тази на щамовете на *S. aureus*. Средните стойности на MPC₅₀ на този хинолон за Грам-положителните бактерии *S. aureus* ($0,25 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$) са по-високи от тези за Грам-отрицателните *E. coli* ($0,18 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$), като разликите са статистически достоверни ($P < 0,05$). Дозата, която изцяло потиска растежа на *S. aureus*, е $1,00 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$, докато за *E. coli* тази доза е по-ниска – $0,70 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$).

Резултатите, получени при определяне на чувствителността на тестваните щамове към енрофлораксина, са противоположни. Те може да се видят на таблица 8, а кумулативните криви на MPC₉₀ – на фигура 2.

Както става ясно от обобщените данни, развитието на изпитаните щамове на *S. aureus* се потиска от много по-ниски концентрации от този хинолон в сравнение с тези за *E. coli* ($P < 0,05$). Отчетените средни стойности на MPC₅₀ за *S. aureus* са $0,018 \pm 0,008 \mu\text{g/ml}$, докато тези за *E. coli* ($0,044 \pm 0,015 \mu\text{g/ml}$) ги надвишават повече от двукратно. Средният диапазон на потискане на растежа на щамовете на *S. aureus*, е $0,076 \pm 0,032 \mu\text{g/ml}$, докато

Таблица 8. Средни стойности на минималните подтискащи концентрации на Enrofloxacin
Table 8 Mean values of the minimum inhibitory concentrations of Enrofloxacin

Микроорганизми / Microorganisms	Щамове бр. / Strains No	МПК в µg/ml / MIC in µg/ml		
		МПК ₅₀ / MIC ₅₀	МПК ₉₀ / MIC ₉₀	Д / D
<i>E. coli</i>	5	0,044 ± 0,015	0,088 ± 0,03	0,175 ± 0,061
<i>S. aureus</i>	7	0,018 ± 0,008	0,038 ± 0,016	0,076 ± 0,032
Общо изследвани / Total examined	12	0,031 ± 0,013	0,062 ± 0,025	0,125 ± 0,05

за *E. coli* стойностите са значително по-високи – 0,175 ± 0,061 µg/ml ($P < 0,05$).

Изследваните бактериални щамове показват по-висока чувствителност към енрофлоксацина отколкото към прадофлоксацина. Разликите в отчетените стойности на МПК са значителни ($P < 0,001$).

Обсъждане

Извършените микробиологични изследвания показват, че папагалите са чувствителни към инфекции, причинявани от стафилококи, стрептококи и ентерококи. От първите най-често са изолирани коагулаза положителните видове *S. aureus* и *S. intermedius*, както и *S. epidermidis*, а от вторите с най-голямо значение се оказват ентерококите. Папагалите показват чувствителност и към *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*. От Грам-отрицателните бактерии най-чести причинители на инфекции са видовете от род *Klebsiella* и *E. coli*. Прави впечатление, че при нашите изследвания не са изолирани *Pseudomonas* spp. и *Proteus* spp. при нито един от изследваните пациенти, т. е. папагалите не показват възприемчивост към тези бактерии.

Данните от антибиотикограмите показват висока ефективност на препарата Veraflox *in vitro*. Неговият безспорен ефект и добра поносимост от папагалите са доказани и *in vivo* чрез успешното му приложение при всички лекувани птици с изключение на десетте пациента в много тежко състояние, пристигнали в напреднал стадий на септицемия. По

тази причина те починаха скоро след това и приложеният антибиотик нямаше време да окаже своето действие, нито организмът им беше в състояние да се справи. Лечението на бактериалните инфекции с антибиотици е успешно след адекватен избор на при направена антибиотикограма. Нашите резултати показват, че прадофлоксацинът е надежден препарат за лечение на различни инфекции при папагали. Разбира се, от значение е също приложението на имуностимуланти, пробиотици и болкоуспокояващи средства.

Резултатите, получени при настоящите експерименти за определяне на МПК показват, че всички изследвани Грам-положителни и Грам-отрицателни щамове проявяват висока чувствителност към двата изпитани хинолона. Това се вижда от ниските стойности на МПК, отчетени при експериментите. Получените от нас резултати са в съответствие с тези на други автори, извършили подобни изследвания при кучета и котки в други страни скоро след въвеждането на прадофлоксацина във ветеринарномедицинската практика. Schink et al. (2013) съобщават, че повечето от тестваните от тях бактерии, изолирани от кучета и котки с различни инфекции (причинени от *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli*, β-хемолитични стрептококи, *Pasteurella multocida* и *Bordetella bronchiseptica*) са показали ниски стойности на МПК₉₀ ≤ 0,25 µg/ml. Единствено *Proteus* spp. и *Pseudomonas aeruginosa* са демонстрирали по-високи стойности на МПК₉₀ ≥ 4 µg/ml. При сравнителни изследвания на антибактериалната актив-

ност на прадофлорксацина Schink et al. (2013) установяват, че неговите МПК са значително по-ниски от тези на други флуорохинолони, като енрофлорксацин и неговия основен метаболит ципрофлорксацин, но също така и марбофлорксацин, орбифлорксацин, дифлорксацин и ибафлорксацин. Според Silley et al. (2007) прадофлорксацинът демонстрира повишена активност по отношение на анаеробни бактерии от различни видове в сравнение с други тествани съединения от тази група, в съответствие с това, което би се очаквало от трето поколение флуорохинолон. Съобщените средни стойности на МПК на прадофлорксацина са 0,25 mg/l в сравнение с 1 mg/l за марбофлорксацин, 2 mg/l за енрофлорксацин и дифлорксацин и 4 mg/l за ибафлорксацин. Всички изследвани от тях изолати са податливи на прадофлорксацин при 2 mg/l, докато диапазонът на МПК се разширява до 32 mg/l за дифлорксацин и 64 mg/l за марбофлорксацин, енрофлорксацин и ибафлорксацин. Тези резултати потвърждават установената от нас висока антибактериална активност на прадофлорксацина, както и на енрофлорксацина, по отношение на изолирани от нас от папагали патогенни Грам-положителни и Грам-отрицателни факултативно анаеробни бактерии. Други автори като Stephan (2008) и Lees (2013) също съобщават за ниски минимални инхибиторни концентрации за бактерии, патогенни за кучета и котки, включително стафилококи. Повишената ефективност на прадофлорксацина в сравнение с останалите хинолони се дължи главно на S, S-пиролидино-пиперидиновата част в молекулата му, а циано групата в нея разширява активността му към щамове, устойчиви към други флуорохинолони (Silley et al., 2007, 2012).

Енрофлорксацинът е синтезиран през 1983 г. за приложение само във ветеринарната медицина. В сравнение с някои от другите хинолони, използвани във ветеринарната медицина, той се отличава със значително по-ниски МПК, както и с ефективност срещу псевдомонади, стрептококи и микоплазми (Scheer, 1987). Нашите резултати са в съответствие с тези данни. Ние също установяваме по-ниски

МПК на енрофлорксацина в сравнение с тези на прадофлорксацина. Съгласно данните от настоящите изследвания енрофлорксацинът е запазил своята висока ефективност като антибактериално средство и днес, след повече от три десетилетия на широко приложение за терапия на различни инфекции при различни видове животни. Неговите МПК за *S. aureus* и *E. coli* са с много ниски стойности. Това е в съответствие с резултатите от наши предишни проучвания (Popova & Todorov, 2008), показващи висока активност на енрофлорксацина срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, изолирани от кучета и котки с различни инфекции. Тогава са установени по-ниски средни стойности на МПК₉₀ за Грам-положителните бактерии ($0,214 \pm 0,042$) в сравнение с тези за Грам-отрицателните ($0,446 \pm 0,104$). Това напълно съответства на данните от настоящите изследвания, при които средните стойности на МПК₉₀ за *S. aureus* са $0,038 \pm 0,016 \mu\text{g/ml}$, докато тези за *E. coli* ($0,088 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) ги надвишават повече от двукратно. Прави впечатление, че тези стойности са по-ниски от получените от нас преди 12 години, което е показател за запазване на антибактериалната активност на енрофлорксацина в максимална степен.

По-ниската чувствителност *in vitro* на изследваните от нас бактериални щамове към Veraflox (прадофлорксацин) в сравнение с тази към енрофлорксацин може да е свързана с влиянието на някои от ексципиентите на използваната емулсия Veraflox. За разлика от нея, изпитаният енрофлорксацин е във воден разтвор, без съдържание на други вещества, които биха могли да повлияят на резултата.

Всички флуорохинолони, включително прадофлорксацинът, убиват бактериите чрез взаимодействие с някои от техните ензими, отговорни за основните функции на ДНК. Прадофлорксацинът инхибира активността на ДНК-гиразата и на топоизомераза IV, които участват в репликацията и рекомбинациите на ДНК, както и в транскрипцията, на което се дължи неговото бързо бактерицидно действие. При анализ на регионите за определяне на хинолоновата резистентност на

целевите гени след въздействие с флуорохинолони се идентифицират двойни мутации в гените, кодиращи в ДНК гиразната субединица A (GyrA) и протеини на топоизомераза IV (GrlA), които се съобщават като причина за развитието на резистентност (Hooper, 2000; Schink et al., 2013; Kizerwetter-Świda et al., 2016). Има обаче и данни за развитие на резистентност на някои важни патогенни бактерии към хинолони. Kizerwetter-Świda et al. (2016) утановяват устойчивост на изпитани от тях резистентни на метицилин изолати на *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) към всички флуорохинолони, включително прадофлорксацин.

През 2007 г. Silley et al. съобщават за висока активност *in vitro* на прадофлорксацина срещу аеробни клинични изолати от кучета и котки. Установените тогава стойности на МПК₉₀ на прадофлорксацина срещу стафилококи, *E. coli*, *Streptococcus* spp. и *Pasteurella multocida* са в границите 0,016–0,25 mg/l. Отчетените от нас стойности са по-високи, но категорично показват, че този хинолон е запазил в максимална степен високата си ефективност срещу *S. aureus* и *E. coli*. Получените от нас резултати сочат, че днес, след 13 години, той все още е високоактивно антиминоробно средство, на което може да се разчита при терапията на бактериални инфекции при животните. Нашите резултати, както и данни на други автори (Lees, 2013) от предклинични и клинични изследвания на прадофлорксацина предполагат, че това средство трябва да бъде избраният флуорохинолон, когато е показано лекарство от този клас. Голямо предимство на прадофлорксацина е успешно то му приложение за лечение на инфекции, причинени от шамове, резистентни към някои други флуорохинолони. Особено важна е намалена му податливост към развитие на бактериална резистентност към него. Друго значително предимство на прадофлорксацина е бързото постигане на максимални плазмени концентрации. Lees (2013) съобщава, че след перорално дозиране на перорална суспензия (при котки) и на таблетки (при кучета) максималните плазмени концентрации на пра-

дофлорксацина се постигат за по-малко от 3,0 h, а крайният му полуживот е от порядъка на 5–10 h. Концентрациите на свободния хинолон в плазмата са в границите на 63–71% от общата концентрация.

Резултатите от нашите клинични проучвания сочат, че след перорално приложение на Veraflox (прадофлорксацин) за терапия на различни инфекции при папагали се постига много висок терапевтичен ефект. Това е в съответствие с данните на Lees (2013), получени при терапия на котки с перорална суспензия Veraflox. Тази суспензия се прилага за пръв път не само у нас, но и в световен мащаб, за лечение на папагали. Успешните резултати са особено обнадеждаващи за разширяване на спектъра на терапевтично използване на Veraflox и при папагалите. Пероралното приложение е щадящо, което е изключително важно за тези чувствителни птици, при които инжектирането води до стрес и риск от усложнения. Третирането с препарата веднъж в денонощието е ефективно и също е голямо предимство с оглед предотвратяване на допълнителен стрес при папагалите.

Изводи

Папагалите показват висока чувствителност към стафилококови и ентерококови инфекции. Тези микроорганизми са изолирани от най-голям брой от изследваните птици с инфекции.

От Грам-отрицателните изолирани бактерии от болни папагали водеща е ролята на *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Не са изолирани *Pseudomonas* spp. и *Proteus* spp. при нито един от изследваните пациенти, т. е. папагалите не показват чувствителност към тези микроорганизми.

Veraflox (прадофлорксацин) перорална суспензия се прилага за пръв път в нашата страна и в света за терапия на папагали с различни инфекции. Той показва много висока ефективност, добра поносимост от папагалите и се оказва отлично средство за лекуване на инфекции при тези птици. Успешно е оп-

ределена дозата на препарата (15 mg/kg ж.т.) и кратността на пероралното му приемане (24 h), при която настъпва антиминобен ефект, без да има неблагоприятни странични въздействия за пациента.

За пръв път не се прави изследване за определяне на МПК на Veraflox – перорална суспензия. Резултатите показват висока антибактериална активност на препарата, съдържащ прадофлоксацин.

Енрофлоксацинът е запазил своята висока ефективност като антибактериално средство и днес, след няколко десетилетия на широко приложение.

Литература

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Cherris, J. C., & Truck, M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493-496.
- Ericsson, H. M., & Sherris, J. C.** (1971). Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, (Suppl. 217), 3-86.
- Govendir, M., Norris, J. M., Hansen, T., Wigney, D. I., Muscatello, G., Trott, D. J., & Malik, R.** (2011). Susceptibility of rapidly growing mycobacteria and *Nocardia* isolates from cats and dogs to pradofloxacin. *Veterinary microbiology*, 153(3-4), 240-245.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneart, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T.** (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition, *Baltimore, Williams & Wilkins*.
- Hooper, D. C.** (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 31(Supplement_2), S24-S28. 13
- Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Rzewuska, M., & Binek, M.** (2016). Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28, (5), 514-518. DOI: 10.1177/10406387166660131jvdi.sagepub.com.
- Lees, P.** (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and therapeutics of pradofloxacin in the dog and cat. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 36(3), 209-221. DOI: 10.1111/jvp.12036.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, J. C., & Tenover, R. H.** (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition, Vol. 2, *ASM Press, Washington, D. C.*, 1726-1760.
- Pallo-Zimmerman, L. M., Byron, J. K., & Graves, T. K.** (2010). Fluoroquinolones: then and now. *Compend Contin Educ Vet*, 32(7), E1-9.
- Papich, M. G.** (2016). Pradofloxacin. In: *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. (Fourth Edition), *Small and Large Animal*, 660-662.
- Popova, T. P., & Todorov, T. A.** (2008). In vitro antimicrobial activity of enrofloxacin against clinical isolates from dogs and cats in Bulgaria. *Folia Veterinaria*, 52(3-4), 124-128. ISSN 0015-5748.
- Scheer, M.** (1987). Studies on the antibacterial activity of Baytril. *Veterinary Medical Review*, 2, 90-99.
- Schink, A. K., Kadlec, K., Hauschild, T., Michael, G. B., Dörner, J. C., Ludwig, C., Werckenthin, C., Hehnen, H. R., Stephan, B., & Schwarz, S.** (2013). Susceptibility of canine and feline bacterial pathogens to pradofloxacin and comparison with other fluoroquinolones approved for companion animals. *Veterinary microbiology*, 22, 162(1), 119-126. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.08.001.
- Silley, P., Stephan, B., Greife, H. A., & Pridmore, A.** (2007). Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(5), 999-1003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm346>.
- Silley, P., Stephan, B., Greife, H. A., & Pridmore, A.** (2012). Bactericidal properties of pradofloxacin against veterinary pathogens. *Veterinary microbiology*, 157(1-2), 106-111.
- Stephan, B., Greife, H. A., Pridmore, A., & Silley, P.** (2008). Activity of pradofloxacin against *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. implicated in periodontal disease in dogs: susceptibility test data from a European multicenter study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), 2149-2155.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 6-th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2 – A6, 17, 1, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninths Informational Supplement. NCCLS Document M100 – S9, Vol. 18, No 1, 1999.