

**Upprepad administrering av
trimetoprim/sulfadiazin till neonatala föl –
plasmaproteinbindning och effekt på
serumbilirubinkoncentrationen.**

Anna-Karin Arnljot

**Handledare: Johan Bröjer
Inst. för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Inger Lilliehöök
Inst. för klinisk kemi**

Innehållsförteckning

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Bakgrund till studien	3
Syfte	3
Litteraturstudie	4
Septikemi hos neonatala föl	4
Generellt om läkemedelsbehandling av neonatala föl	6
Antibiotikabehandling vid bakteriell septikemi hos föl	8
Trimetoprim/sulfadiazin	9
Kernikterus	10
Jämviktsdialys	12
Material och Metoder	13
Resultat	14
Serumkoncentration bilirubin	14
Plasmaproteinbindningsgrad bilirubin	17
Plasmaproteinbindningsgrad trimetoprim/sulfadiazin	17
Diskussion	18
Konklusion	20
Tack Till	20
Fotnoter	21
Litteraturförteckning	22

SAMMANFATTNING

Idag bygger de flesta doseringsangivelser inom hästmedicinen på data från vuxna hästar. Detta kan skapa problem då läkemedelsomsättningen hos neonatala föl kan skilja sig från omsättningen hos vuxna hästar. Neonatal sepsis är en vanlig anledning till morbiditet och mortalitet hos föl och kräver snabbt insatt antibiotikabehandling. I Sverige används ofta kombinationen trimetoprim/sulfadiazin tillsammans med bensylpenicillin. Vid användning av läkemedel kan interaktioner mellan läkemedlen och endogena substanser inträffa. Ett exempel på detta är så kallad "displacement" där det uppstår en konkurrenssituation mellan läkemedlet och endogena substanser om bindningsplatser på plasmaproteiner. Detta gäller framför allt endogena substanser med hög proteinbindningsgrad och risken för displacement är större vid användning av ett läkemedel som själv har hög proteinbindningsgrad. Bilirubin är ett exempel på en endogen substans med hög proteinbindningsgrad, > 99 %. Vid displacement innebär detta att fritt okonjugerat bilirubin i större utsträckning riskerar att passera blodhjärnbarriären och orsaka skada, så kallad kernikterus. Kernikterus har framförallt rapporterats på neonatala barn och är väldigt sällsynt hos djur. Kernikterus på föl i samband med trimetoprim-sulfadiazinbehandling finns inte rapporterat men teoretiskt är det fullt möjligt att föl skulle kunna drabbas. Denna studie syftar till att undersöka om den nuvarande doseringen för trimetoprim/sulfadiazin är säker att använda för neonatala föl med avseende på displacement av bilirubin.

Sju kliniskt friska varmblodiga travarföl injicerades intravenöst med trimetoprim/sulfadiazin i doseringen 15 mg/kg q 12 h under tre dagar. Blodprov togs dagligen vid samma tidpunkt i fyra dagar och koncentrationen totalprotein, albumin och bilirubin (totalt, konjugerat, okonjugerat samt fritt okonjugerat) i plasma analyserades. Blodprov togs vid samma tidpunkter hos en matchad kontrollgrupp på sju friska föl. Inga skillnader i nivåer av de olika parametrarna kunde ses mellan fölen som behandlats med trimetoprim/sulfadiazin och kontrollgruppen. Koncentrationen fritt okonjugerat bilirubin analyserades med hjälp av jämviktsdialys och inte heller där sågs några skillnader mellan fölen som behandlats med trimetoprim/sulfadiazin och kontrollgruppen. Proteinbindningsgraden uppmättes till 23 % för trimetoprim och 14 % för sulfadiazin, vilket är lägre än proteinbindningsgraden för vuxna hästar på 35 % respektive 20 %. Resultaten i denna studie, samt den kliniska erfarenheten med avsaknad av rapporterade fall av kernikterus på föl i samband med trimetoprim/sulfadiazinbehandling, tyder på att den dosering av trimetoprim/sulfadiazin som idag används inte ökar risken för kernikterus hos neonatala föl. Denna studie har dock utförts på kliniskt friska föl. Eftersom man vet att diverse sjukdomstillstånd påverkar omsättningen av olika substanser bör vidare studier utföras där man fokuserar på föl sjuka i sepsis, och gärna även yngre neonatala samt prenatala föl.

SUMMARY

Today most dosages used in horse medicine are based on studies in adult horses. Since there are differences between adult and neonatal horses with respect to different pharmacological parameters this can cause problems when administering drugs to neonatal foals. Neonatal sepsis is a common cause of morbidity and mortality in foals and aggressive antibiotic treatment is needed immediately when sepsis is suspected. In Sweden the combination of trimethoprim/sulphadiazine and benzylpenicillin is often used as the initial treatment. When administering drugs, interactions can occur between the drugs and endogenous substances. An example of such an interaction is called “displacement” and refers in this case to the competition for binding places on plasma proteins between drugs and highly protein-bound endogenous substances. Drugs that themselves are highly protein-bound are at a greater risk for displacement. Bilirubin is an example of an endogenous substance that to a great extent (>99 %) is bound to albumin. When displacement occur more free unconjugated bilirubin becomes available systemically and to a greater extent can pass the blood-brain barrier and cause cellular damage, so called kernicterus. Kernicterus has mostly been reported in neonatal children and is rarely seen in animals. Kernicterus in foals in association with trimethoprim/sulfadiazine treatment has not been reported but it is theoretically possible that also foals could be affected. The aims of the study were to evaluate the dosage used today and its safety with respect to displacement of bilirubin.

Seven healthy foals were treated with trimethoprim/sulfadiazine, 15 mg/kg q 12 h for three days. Blood samples were taken daily at the same time points during four days and the concentrations of total protein, albumin and bilirubin (total, conjugated, unconjugated and free unconjugated) were analysed in plasma. Blood samples were taken at the same time points in a matched control group with seven healthy foals. No differences in levels between the different parameters were seen between the foals treated with trimetoprim/sulfadiazin and the controls. The concentration of free unconjugated bilirubin was analysed with equilibrium dialysis and no differences were seen between the foals treated with trimetoprim/sulfadiazin and the control group. The protein binding was 23 % for trimethoprim and 14 % for sulfadiazine, which is a bit lower than the protein binding measured in adult horses at 35 % and 20% respectively. The results in this study, and the clinical experience without reported cases of kernicterus associated with treatment of trimethoprim/sulfadiazin, implies that the dosage used today does not seem to enhance the risk of kernicterus in neonatal foals. One should, however, consider that this study was performed on clinically healthy foals. Since it is known that many diseases affect the turnover of different endogenous and exogenous substances, further studies are warranted in which focus should be put on septicemic foals, younger neonatal and prenatal foals.

INLEDNING

Septikemi är den vanligaste anledningen till att föl dör under den första levnadsveckan (Paradis, 1997). Ett neonatalt föl har ett omoget immunsystem och mycket sämre förutsättningar att bekämpa infektioner än en vuxen häst (Becht & Senrad, 1985). Detta beror bland annat på att neonatala individers fagocyterande celler har sämre förmåga till chemotaxis, att leukocyterna har nedsatt bakteriedödande förmåga och att komplementförsvaret inte är lika effektivt som hos vuxna individer (Koterba et al. 1984). Vid septikemi hos föl är en snabbt insatt behandling avgörande för fölets prognos. Man måste därför påbörja antibiotikabehandling redan innan provsvar från blododling erhållits (Magdesian, 2003). I Sverige ses framförallt gramnegativa bakterier i samband med sepsis, men även grampositiva bakterier kan påvisas (Johansson, 2006). Därför måste ett bredspektrumantibiotika sättas in vid den initiala behandlingen av neonatal sepsis (Henry-Barton, 2006). I Sverige används bensylpenicillin i kombination med gentamicin eller trimetoprim-sulfa vid behandling av sepsis hos föl (Johansson, 2006). Gentamicin har dock nackdelar i form av njurtoxicitet och att det ej passerar blod-hjärnbarriären varför trimetoprim/sulfadiazin (TMP/SDZ) torde vara ett bra förstahandsval i kombination med bensylpenicillin (Caprile & Short, 1987). Den dosering för TMP/SDZ som används idag är dock inte testad på neonatala föl utan bara på vuxna hästar. Eftersom läkemedelsomsättningen hos neonatala föl kan skilja sig från omsättningen hos vuxna hästar skulle detta kunna leda till oönskade biverkningar eller suboptimal effekt (Magdesian, 2003).

Bakgrund till studien

Fördjupningsarbetet är en del av ett forskningsprojekt som omfattar studier av TMP/SDZ hos neonatala föl vad beträffar farmakokinetik, proteinbindning till plasmaproteiner, resistensmönster och läkemedlets effekt på plasmaproteinbindningen av bilirubin. Under våren 2007 utfördes en pilotstudie där farmakokinetiken hos TMP/SDZ studerades hos två neonatala föl. Resultaten av undersökningen talar för att det finns en relativt god farmakokinetisk överensstämmelse hos substansen sulfadiazin mellan vuxna hästar och neonatala föl. Däremot varierade clearance och halveringstiden relativt mycket hos substansen trimetoprim mellan de två fölen. Orsaken till detta skulle kunna vara variationer i proteinbindningsgrad och proteinnivåer mellan fölen (Hjalmarson Vertovec, 2007). Detta undersöks närmare i detta fördjupningsarbete som förutom proteinbindningsgrad och proteinnivåer även undersöker nivåerna av konjugerat och okonjugerat samt fritt okonjugerat bilirubin. Fritt okonjugerat bilirubin har visat sig kunna ge upphov till kernikterus. Hos neonatala barn sågs ett samband med behandling med sulfonamider och kernikterus på grund av sulfonamidernas höga proteinbindningsgrad (Silverman et al. 1956). Kernikterus hos djur är väldigt ovanligt och inga rapporter finns om att kernikterus hos föl skulle ha orsakats av behandling med trimetoprim/sulfadiazin, men inga tidigare studier finns där bilirubins proteinbindningsgrad eller risk för displacement av bilirubin undersökts.

Syfte

Studien syftar till att studera plasmaproteinbindningsgraden för TMP/SDZ samt dess effekt på bilirubinnivåer hos neonatala föl. Trots att kernikterus ej rapporterats i samband med TMP/SDZ-behandling av föl är det teoretiskt möjligt att förhöjda plasmakoncentrationer av fritt okonjugerat bilirubin kan orsakas av

behandling med TMP/SDZ. Detta har inte studerats tidigare. Frågeställningen är således viktig att besvara för att en säker och effektiv intravenös dosering av TMP/SDZ (Hippotrim® vet) skall kunna erhållas.

LITTERATURSTUDIE

Septikemi hos neonatala föl

Sepsis kan orsakas av bakterier, virus och svampar, där bakterier är absolut vanligaste agens (Paradis, 2006). Då bakterier eller deras produkter tar sig in i blodet kommer kroppens immunförsvar att aktiveras, både lokalt och systemiskt. Om man inte tidigt i sjukdomsskedet får bukt med infektionen är risken stor att sjukdomen progriderar till SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) där det normala immunsvaret går överstyr. Kroppens inflammationsmediatorer orsakar då vasodilatation, vätskeutträde ur kärlen, vävnadsödem, sänkt hjärtminutvolym, sänkt blodtryck och nedsatt vävnadsperfusion, vilket innebär att fölet hamnar i septisk chock. Om man i detta skede inte lyckas häva SIRS kommer detta leda till dysfunktion av ett eller flera organsystem (MODS - Multiple Organ Dysfunction Syndrome) vilket i slutändan kan leda till organsvikt och död (Furr, 2003). Tidig upptäckt av sepsis är därför av största vikt för att ett föl ska kunna räddas.

Föl kan drabbas av en bakteriell infektion redan intrauterint, exempelvis om stoet själv lider av sepsis eller placentit. Extrauterina infektionsportar är respirationssystemet, mag-tarmkanalen, sår och navelsträngen. De extrauterina infektionerna associeras ofta med att fölen fått för lite råmjölk (PFPT –partial failure of passive transfer)(Paradis, 1994). Andra riskfaktorer för sepsis är prematuritet, dysmaturitet och dystoki. Dessa predisponerar troligen för sepsis då de innebär att fölet ofta föds svagt och det då blir svårare för fölet att komma igång och få i sig tillräckligt med råmjölk (Furr, 2003). Flera studier finns som visar på råmjölkens värde för ett neonatalt föl. Robinson och medarbetare (1993) genomförde en studie där två grupper föl hölls på samma anläggning och skötsel och miljö optimerades för att minska risken för infektioner. Den ena gruppen fick råmjölk medan den andra istället fick komjölk under det första dygnet. Av de åtta föl som ej fick råmjölk drabbades sju av symtom på sepsis och sepsis konfirmerades hos fem av fölen via positiv blododling. Ingen av de föl som fick råmjölk drabbades av sepsis. Man bör dock ha i minnet att inte alla föl med låga imunoglobulinnivåer drabbas av sepsis – skötseln av fölet och hygien i stallet kan vara avgörande för fölets hälsa (Paradis, 1994).

Symtom på sepsis

Tidiga symtom på sepsis kan vara vaga och variera stort mellan olika föl. Faktorer i anamnesen som bör göra veterinären misstänksam är om det varit problem kring förlossningen, om stoet varit sjukt under prenatalperioden, om stoet haft flytningar eller om det tagit längre tid än normalt för fölet att komma igång och dia. Ett av de första tecknen på sepsis är att fölet är tröttare än normalt och ligger mycket. Föl med sepsis har även ofta nedsatt sugreflex, de går inte upp i vikt på ett normalt sätt och är allmänt nedsatta. Andra symtom kan vara diarré, artrit, meningit och symtom från respirationsorganen. Septiska föl kan ha feber, undertemperatur eller

normal kroppstemperatur (Paradis, 1997). Då SIRS börjat affektera fölet ses i ett tidigt stadie kärlnjicerade slemhinnor och takykardi men normalt blodtryck och CRT (capillary refill time). I senare stadier då fölet gått in i septisk chock karaktäriseras den kliniska bilden av en vävnadshypoperfusion. Då ses långsam CRT, blekgrå slemhinnor, hypotension, kalla extremiteter och sänkt medvetandegrad. Om fölet är i långt gången septisk chock är prognosen för överlevnad väldigt dålig trots att aggressiv terapi sätts in (Koterba & House, 1996).

Provtagning

Det finns tyvärr inget enkelt snabbtest man kan använda för att avgöra om ett föl har sepsis. För en definitiv diagnos krävs ett positivt blododlingssvar eller obduktion. Tyvärr tar det minst 24 timmar innan man får blododlingssvar och väntar man så länge med att sätta in behandling är risken stor att fölet inte går att rädda (Koterba et al. 1984). Man vill heller inte dra igång en dyr sepsisbehandling på ett föl som ej lider av sepsis med tanke på ekonomi, bieffekter av antibiotikan och resistensutveckling. Därför har man vid University of Florida utvecklat en så kallad "sepsis score" för att bedöma sannolikheten att ett föl har sepsis eller ej. Med hjälp av denna ges anamnes, fynd vid den kliniska undersökningen och laboratorievärden olika poäng som vägs ihop i ett särskilt protokoll som hjälper klinikern att bedöma varje enskilt föl. Vid värden ≥ 12 är sannolikheten stor att fölet har sepsis medan värden ≤ 11 tyder på att fölet sannolikt ej lider av sepsis. I en studie har Brewer och Koterba (1988) visat på en sensitivitet på 93 % och en specificitet på 86 % för denna sepsis score. Sepsis score systemet har fått en stor klinisk användning men systemets relevans ifrågasätts dock av vissa författare. I en utvärdering av sepsis score systemet kom Corley och Furr (2003) fram till att det inte uppnår lika hög sensitivitet (67 %) och specificitet (76 %) då det används på andra kliniker än den klinik det konstruerades för. Det största problemet de uppmärksammade var att systemet gav för många falskt negativa svar vilket är allvarligt eftersom sjuka föl riskerar att missas och ej få behandling i tid.

Vid misstanke om lokaliserad infektion i samband med septikemin kan prov tas från andra kroppsvätskor, exempelvis från cerebrospinalvätska om man misstänker meningit eller från synovia vid artritmisstanke (Furr, 2003). Andra intressanta prover vid sepsismisstanke är blodprov för hematologi, differentialräkning, fibrinogen och blodglukosnivåer. Hos föl med sepsis ses ofta neutropeni och ökat antal stavkärniga neutrofiler, ofta med toxiskt utseende. Fibrinogen stiger 48 - 72 timmar efter en akut inflammation varför provtagning inom denna tidsrymd kan ge falskt låga värden trots att fölet har sepsis. Ett högt fibrinogenvärde på ett föl som är yngre än 24 timmar indikerar att fölet blivit infekterat in utero. Föl med sepsis är ofta hypoglykemiska eftersom de vanligtvis inte får i sig tillräckligt med näring och infektionen i sig förbrukar mycket glukos (Paradis, 1994).

Ett enkelt test som bör göras på alla föl med misstänkt sepsis är att mäta deras immunoglobulinhalt i blodet. Enkla fälttest finns utvecklade där man får svar på bara några minuter. Svaret kan vara en god vägledning både då det gäller att värdera om fölet har sepsis eller ej samt för vidare behandling av fölet (Paradis, 1994).

Prognos

Prognosen vid neonatal sepsis beror på typ av infektion, hur allvarlig den är och hur snabbt man sätter in behandling. Om man upptäcker sepsis tidigt är prognosen avvaktande till god (Reed et al. 2004). Prognosen är dålig för föl som behandlas sent i sjukdomsförloppet eftersom infektionen då ofta är etablerad i flera organ, framförallt i ben och leder. Även om fölet överlever så får den ofta kroniska komplikationer, vilket försämrar prognosen på lång sikt (Koterba et al. 1996). I en studie där man undersökte sannolikheten att ett fullblodsföl som haft septisk artrit kommer till start på galoppbanan sågs att föl med septisk artrit inte kom till start i samma utsträckning som friska föl. Man såg dock ingen skillnad i startfrekvens mellan föl som samtidigt med septisk artrit hade multisystemisk påverkan och föl som enbart led av septisk artrit (Smith et al. 2004).

Behandling vid neonatal septikemi

Vid septikemi hos föl är en snabbt insatt behandling avgörande för fölets prognos. Man måste därför påbörja antibiotikabehandling redan innan provsvar från blododling erhållits (Magdesian, 2003). I ett examensarbete vid fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap undersöktes retrospektivt bakteriefördelningen vid sepsis hos föl vid två stora hästkliniker i Sverige. Där visades att 63 % av de framodlade bakterierna var gramnegativa och utav dem var *Escherichia Coli* den vanligaste. Andra gramnegativer som isolerats i samband med septikemi hos föl är *Aktinobacillus equii*, *Aktinobacillus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* och *Enterobacteriaceae*. Av de grampositiva bakterier som isolerades i samband med sepsis vid KM stordjur, Uppsala 1988-2005, var *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp* och *Stafylococcus spp* de vanligaste (Johansson, 2006). Eftersom både grampositiva och gramnegativa bakterier ses i samband med sepsis måste ett bredspektrigt antibiotika väljas vid den initiala behandlingen (Henry-Barton, 2006).

Enbart antibiotikabehandling räcker inte som behandling vid sepsis. Övrig behandling som brukar bli aktuell är vätsketerapi, näringstillförsel, plasma om fölet har lågt IgG och god omvårdnad. En ren miljö är jätte viktig och det gäller att hålla fölet varmt och skydda det från liggsår. Att mäta och kontrollera kroppstemperaturen, vätskebalansen, blodgaser och syra-bas balans är av stort värde (Koterba & House, 1996).

Läkemedelsbehandling av ett nyfött föl är dock inte helt enkelt. Många kroppsfunktioner är inte helt utvecklade, vilket innebär att föl inte fungerar farmakologiskt som vuxna hästar (Magdesian, 2003).

Generellt om läkemedelsbehandling av neonatala föl

Neonatalperioden hos däggdjur varierar mellan olika arter. Föl anses ha en kort neonatalperiod och den ligger på ca en vecka jämfört med en månad hos andra djur som kalvar, kultingar och valpar (Baggot, 1994).

Neonatala föl är generellt sätt mer känsliga för läkemedel jämfört med vuxna hästar och risken för oväntade biverkningar är därmed större hos föl. Detta beror till exempel på att leverns och njurens mekanismer för metabolism och utsöndring av substanser inte är fullt utvecklade hos ett föl (Baggot & Short, 1984). Att direkt

extrapolera en dosering i mg/kg kroppsvikt för en vuxen häst till ett föl kan således få oväntade konsekvenser (Baggot, 1997). Vilken effekt ett läkemedel har på individen är beroende av hur väl det når sitt mål och hur snabbt det elimineras från kroppen. Hur läkemedlet processas i kroppen kan delas in i fyra olika faser; absorption, distribution, metabolism och utsöndring (Caprile & Short, 1987) Inom alla dessa fyra områden ses skillnader mellan föl och vuxna hästar.

Absorption

Under fölets första levnadstid är epitelet i gastrointestinalkanalen mer permeabelt än hos en vuxen häst. Det innebär att läkemedel som ges oralt åtminstone den första levnadsveckan kan förväntas ha högre biotillgänglighet hos ett föl. Under fölets 24 första timmar ses på grund av colostrumupptag även en hög permeabilitet för makromolekyler. Detta för med sig att även läkemedel som normalt sett inte tas upp via tarmen kan ge systemiska effekter. Detta gäller exempelvis lokalt i tarmen verkande sulfonamider och aminoglykosider (Vaala, 1985).

Andra faktorer som pH i ingestan och dess innehåll spelar också roll för upptaget av olika läkemedel. Hos neonatala föl är pH relativt högt i magsäcken och främre delen av tunntarmen. Läkemedel som är salter eller svaga baser absorberas därför lättare under de två första veckorna. Därefter kommer pH successivt att sjunka på grund av ökat mjölkintag och ökad pepsinproduktion och detta leder i sin tur till bättre absorption av sura läkemedel. Den höga halten kalcium i mjölken kan också påverka absorptionen då vissa läkemedel som exempelvis tetracykliner gärna kelaterar och bildar kalcium-kelat komplex som är svåra att ta upp via tarmen. Man kan därför räkna med långsam absorption av sådana läkemedel så länge fölet diar (Caprile & Short, 1987).

Distribution

Distributionen av ett läkemedel i kroppen påverkas av ett flertal faktorer varav de viktigaste är distributionsvolym, plasmaproteinbindning och fysiologiska barriärer förutom läkemedlets fysikaliska/kemiska egenskaper. Neonatala föl består till 70-75 % av vatten medan siffrorna hos en vuxen häst ligger på 50-60 % (Baggot & Short, 1984). Fölet har nästan dubbelt så stor volym extracellulär vätska jämfört med en vuxen häst, ca 44 % hos föl mot ca 22 % hos den vuxna hästen (Kami et al 1984) . Hos föl överstiger därmed den extracellulära vätskan nivån av intracellulär vätska, vilket får till följd att distributionsvolymen för läkemedel som distribueras i den extracellulära vätskan ökar. Detta innebär att polära substanser som penicillin och aminoglykosider samt substanser som fördelar sig jämnt i kroppsvätskorna får en ökad distributionsvolym, vilket ger lägre plasmakoncentrationer (Vaala 1985, Baggot & Short, 1984).

Hos många neonatala djur ses en hypoalbuminemi under de två första levnadsveckorna (Vaala, 1985). Caprile och Short (1987) anser dock att denna är marginell hos neonatala föl. Hur stor mängd av läkemedlet som binds till plasmaproteiner, framförallt albumin, spelar stor roll för distributionen eftersom det bara är den fria fraktionen läkemedel som kan utöva någon effekt i kroppen. För starkt albuminbundna substanser ger en liten minskning i proteinbindningsgraden en kraftig ökning i den obundna fraktionen. En minskning

av proteinbindningsgraden från 98 % till 96 % ger en dubbling av den farmakologiskt aktiva obundna fraktionen (Klammt et al. 2008).

Blod-hjärnbarriären är mer permeabel hos neonatala föl än vuxna hästar. Detta innebär att substanser som normalt inte tar sig in till CNS, exempelvis bilirubin, penicillin och klindamycin, kan penetrera till hjärnvävnaden. Substanser som normalt penetrerar blod-hjärnbarriären kan lokalt få ännu högre koncentration i CNS och därmed större effekt under denna period (Caprile & Short, 1987).

Metabolism

Den största delen av läkemedelsmetabolismen sker i levern där flera enzymssystem används för att konvertera fettlösliga läkemedel till mer polära föreningar som kan utsöndras via urinen. Detta sker genom oxidering, reduktion, hydroxylering och glukoronidering varav oxidering och glukoronidering är de vanligaste processerna (Baggot, 1994, Caprile & Short, 1987). Neonatala däggdjur har generellt sett en ofullständig funktion i dessa system vilket leder till fördröjda halveringstider för många läkemedel och risk för att ett läkemedel ackumuleras efter upprepad dosering. (Baggot, 1994). Det är stora skillnader mellan olika arter och att jämföra arters metabolism är därför svårt. Vissa enzymatiska system verkar utvecklas snabbare hos föl än andra neonatala djur (Vaala, 1985). Metabolismen av antibiotikumet kloramfenikol ger ett indirekt stöd till denna tes. Metabolismen av klormafenikol sker nämligen till stor del genom konjugering till glukuronsyra i levern (Fass, 2008). Studier av Burrows och medarbetare (1983) har visat att neonatala kalvar har en fördröjd elimination av kloramfenikol ända upp till 4-6 veckors ålder medan neonatala föl enligt Brumbaugh och medarbetare (1983) redan inom nio dagar från födelsen når upp till halveringstider motsvarande vuxna hästar.

Utsöndring

Merparten av alla läkemedel och dess metaboliter elimineras från kroppen via njurarna. Hos de flesta neonatala djur är njurarna omogna och njurfunktionen relativt ineffektiv, men skillnaderna mellan arter är stora. Det finns lite forskning på området gällande föl, men studier på farmakokinetik för antimikrobiella substanser som elimineras via njurarna har indirekt antytt att njurfunktionen hos föl utvecklas relativt snabbt (Baggot, 1994).

Hos alla neonatala djur är pH i urinen sur vilket kan leda förlängd utsöndring för svaga organiska syror som exempelvis sulfonamider (Baggot & Short, 1984).

Antibiotikabehandling vid bakteriell septikemi hos föl

I Sverige används bensylpenicillin i kombination med gentamicin eller kombinerat med trimetoprim/sulfonamid (TMP/SDZ) för behandling av septikemi hos föl (Johansson, 2006). I exempelvis USA används kombinationen bensylpenicillin och gentamicin eller amikacin. Många kliniker där föredrar amikacin då den verkar vara mindre nefrotokisk och visar mindre risk för resistens än gentamicin (Koterba & House, 1996). I många länder är resistensen utbredd mot TMP/SDZ medan läget i Sverige ser bättre ut. Studier vid Irish Equine Center har visat på en resistens på 40 % för *E. Coli* mot TMP/SDZ medan samma siffror

i Sverige bara ligger på 5 % (Johansson 2006, Baggot 1994). Ytterligare faktorer som ger TMP/SDZ fördelar gentemot aminoglykosider är att aminoglykosiderna är njurtoxiska och att de inte passerar blod-hjärnbarriären. Vid septikemi är meningit en känd komplikation varför TMP/SDZ som passerar blod-hjärnbarriären torde vara ett bättre val (Caprile & Short, 1987).

Trimetoprim/sulfadiazin

Kombinationen trimetoprim/sulfadiazin finns på den svenska marknaden både som injektionslösning och för oral giva. Trimetoprim samt sulfadiazin finns i preparaten i förhållandet 1:5. De båda substanserna har var för sig bakteriostatisk effekt genom att hämma var sitt steg i bakteriers folsyrasyntes, men tillsammans får de synergistisk effekt och kombinationen anses vara baktericid när förhållandet mellan substanserna är optimal dvs 1:20. Sulfadiazin blockerar omvandlingen av paraaminobensoesyra (PABA) till dihydrofolatsyra (DFA) och trimetoprim blockerar omvandlingen av DFA till tetrahydrofolatsyra genom att inhibera enzymet dihydrofolatreduktas (Plumb, 2008). TMP/SDZ har ett brett antibakteriellt spektrum och är verksamt mot både grampositiva och gramnegativa bakterier (Fass, 2008)

Trimetoprim är en diaminopyrimidinanalog som är en fettlöslig svag bas. Den metaboliseras via oxidering och konjugering i levern och utsöndras via njurarna. Trimetoprim används i princip aldrig ensam inom veterinärmedicinen utan ses oftast i kombination med en sulfonamid (Spoo & Riviere, 2001).

Dagens sulfonamider är derivat till sulfanilamid som var den första sulfonamiden som började användas på 40-talet. Idag finns många sulfanilamidderivat med olika farmakokinetiska och antimikrobella egenskaper. Denna studie fokuserar på sulfadiazin som är en svag syra. Sulfadiazin metaboliseras framför allt via acetylering och glukuronidering i levern. (Spoo & Riviere 2001, Fass 2008).

Både trimetoprim och sulfadiazin har god absorption från mag-tarmkanalen (Gustavsson et al. 1999). De distribueras väl ut i vävnaderna och vid meningit blir koncentrationen i cerebrospinalvätskan relativt hög. (Plumb, 2008).

Sulfonamidens plasmaproteinbindningsgrad varierar mellan olika sulfonamider men även mellan olika arter. Proteinbindningsgrader mellan 15-90 % har uppmätts för olika sulfonamider (Spoo & Riviere, 2001). Sulfonamidernas ibland väldigt höga proteinbindningsgrad skulle kunna medföra risker vid behandling av neonatala föl. Genom sin bindning till albumin kan sulfonamiderna nämligen konkurrera med andra substanser, som också binder till albumin. Dessa ämnen kan utgöras av andra läkemedel men det kan också röra sig om kroppsegna substanser, exempelvis bilirubin. Detta innebär alltså att man riskerar få förhöjda halter antingen av läkemedel eller av bilirubin i blodet, så kallat displacement (Caprile & Short, 1987). Displacement kan även innebära konkurrens om bindningsplatser på plasmaproteinerna mellan två olika läkemedel. Detta kan leda till oväntade biverkningar då man riskerar att få en för hög verksamt koncentration av något av de inblandade läkemedlen. Risken för displacement är större vid användning av läkemedel med hög proteinbindningsgrad (Brodie, 1965). Hos neonatala barn har konkurrens i bindningen till albumin mellan sulfonamider med hög proteinbindningsgrad och bilirubin visat sig kunna ge upphov till kernikterus (Caprile & Short, 1987). Proteinbindningsgraden varierar mellan olika

sulfonamider. Sulfonamiden i denna studie, sulfadiazin, har enligt Gustavsson et al. (1999) en proteinbindningsgrad på 20% vilket måste räknas som relativt lågt inom gruppen sulfonamider. Proteinbindningsgraden för trimetoprim är lite högre, 35 % (Gustavsson et al. 1999).

Kernikterus

Inom humanmedicinen fick man i slutet av 50-talet upp ögonen för hur farmakologin skiljer sig mellan vuxna och neonatala barn genom ett par läkemedelsstudier med tragisk utgång. I en av dessa studier undersöktes två olika profylaktiska antibiotikabehandlingar för att förebygga sjukhusinfektioner hos prematura barn. En av grupperna behandlades med sulfonamiden sulfafurazol och inom denna grupp sågs en ökad förekomst av kernikterus hos de barn som var ikteriska. Detta ledde till dödsfall och svåra hjärnskador hos flera barn (Silverman et al, 1956).

Kernikterus definieras som ”en makroskopisk gulfärgning av specifika subkortikala nervkärnor i hjärnan där man mikroskopiskt kan visa att neuronerna i dessa kärnor tagit skada” (Watchko & Maisels, 2003). Skadorna orsakas av att fritt okonjugerat bilirubin tagit sig in i hjärnvävnaden och utövat cytotoxisk effekt på nervcellerna (Greenberg, 2002). Symtom vid kernikterus hos människa beror på vilka delar av hjärnan som drabbats och bland symtomen ses bland annat ikterus, feber, retrocollis, opistotonus, krampanfall och akut död (Laynachan et al. 2007).

Det mesta av bilirubinet i kroppen bildas genom nedbrytning av hemoglobin från uttjänta röda blodkroppar, men bilirubin kommer också från andra substanser som myoglobin och cytokromer. Pigmentet tas upp av makrofager i mjälten, benmärgen och levern som omvandlar det till biliverdin. Biliverdinet omvandlas därefter till bilirubin som frisätts från cellen som fritt okonjugerat olösligt bilirubin. Det okonjugerade bilirubinet binder till albumin och transporteras till levern där det konjugeras till glukuronsyra för att bli vattenlösligt och lättare att utsöndra (Reed et al. 2004).

I blodet finns bilirubin antingen konjugerat till glukuronsyra eller i en okonjugerad form. Det okonjugerade bilirubinet är till 99 % bundet till plasmaproteiner, företrädesvis albumin, och det är bara den fria fraktionen av det okonjugerade bilirubinet som kan ta sig in i hjärnan och orsaka skada (Brito et al. 2006). Bilirubins neurotoxicitet består i att det fria okonjugerade bilirubinet tar sig in i neuroner och inducerar flera patologiska processer. I nervcellen stör det fria obundna bilirubinet mitokondiefunktionen genom att koppla ifrån den oxidativa fosforyleringen och inhibera calmodulin-beroende proteinkinaser II. Nervcellen dör på grund av att kalciumhomeostasen störs och på grund av ackumulering av glutamat. Glutamat är en neurotransmittor vars upptag i cellerna minskas i närvaro av okonjugerat bilirubin. Detta leder till en ackumulering av extracellulärt glutamat som ger en ökad stimulering av nervcellerna vilket i sin tur leder till degeneration, nekros och/eller apoptos (Loynachan, 2007).

Neonatala individer löper mycket större risk att drabbas av hyperbilirubinemi och kernikterus än vuxna. Det beror på en kombination av flera faktorer, både fysiologiska och patologiska:

- Neonataler har en högre bilirubinproduktion än vuxna eftersom deras röda blodkroppar har kortare livslängd och byts ut snabbare (Hillman, 2007)
- Neonataler har sämre upptag av bilirubin till levern. För att transporteras in i leverns hepatocyter binder bilirubin till bärarproteinet ligandin och hos neonataler är nivåerna av ligandin låga (Bauer et al. 1989).
- Nedsatt konjugering. Konjugeringen i levern av bilirubin till glukuronsyra katalyseras av enzymet uridindifosfoglukonuratglukuronosyltransferas (UGT). Neonataler har låga nivåer UGT och konjugeringen går således långsammare än hos vuxna. Hos neonatala barn är nivåerna UGT vid födelsen ca en procent av nivåerna hos en vuxen och hos ett för tidigt fött barn är nivåerna ännu lägre (Hillman, 2007)
- Ökad enterohepatisk cirkulation hos neonataler. Hos en vuxen individ är den enterohepatiska cirkulationen av bilirubin låg. Det mesta av det konjugerade bilirubinet utsöndras till tarmen där det omvandlas av tarmbakterier och utsöndras via avföringen. Tarmfloran hos neonataler är dock inte fullt utvecklad så det konjugerade bilirubinet kan hos dem komma att ansamlas i tarmen. En del av detta bilirubin kommer konverteras tillbaka till okonjugerat bilirubin och tas upp i blodet igen via den enterohepatiska cirkulationen (Hillman, 2007).

Hos föl ses normalt sett höga bilirubinnivåer under de 48 första timmarna och nivåerna sjunker sedan successivt för att ligga på normala värden för en vuxen häst vid två veckors ålder. Konjugeringen och därmed utsöndringen av bilirubin går långsammare hos ett föl de första 1-5 dyggen på grund av att de har lägre koncentration glukuronyltransferas än en vuxen häst (Becht & Senrad, 1985). Bilirubin ska hos en frisk vuxen häst inte kunna penetrera blod-hjärnbarriären. Hos ett neonatalt föl är dock blod-hjärnbarriären inte fullt utvecklad vilket innebär att fritt okonjugerat bilirubin kan ta sig in till hjärnvävnaden (Caprile & Short, 1987).

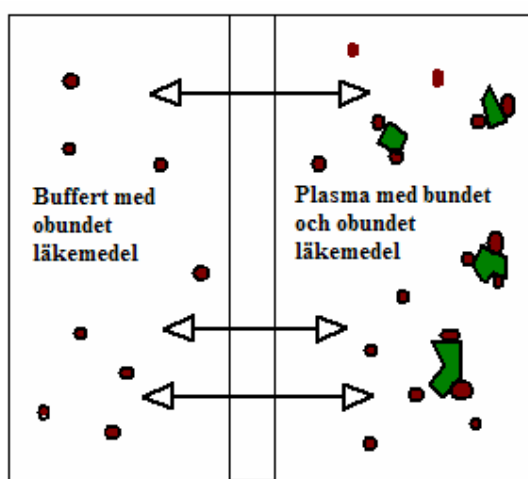
Fritt okonjugerat bilirubin har inte bara cytotoxiska effekter på nervceller utan kan även påverka erythrocyter. In vitro studier har visat att bilirubin binder till erythrocyternas cellmembran och orsakar upplösning av membranstrukturen, morfologiska förändringar och slutligen hemolys. Acidosis vilket kan ses i samband med sepsis ökar denna process. Erythrocyter från neonataler är mer känsliga för skada på grund av det fria okonjugerade bilirubinet än erythrocyter från vuxna människor. Bilirubinets skador på erythrocyterna leder till en ond cirkel då hemolysen som det fria bilirubinet orsakar ger en ökad erytrofagocytos. Därmed bildas en ökad mängd bilirubin som i sin tur driver hemolysen vidare och förvärrar hyperbilirubinemin (Brito et al, 2006)

Kernikterus ses framförallt hos nyfödda barn och är väldigt ovanligt hos djur. Faktorer som ökar risken för att utveckla kernikterus är prematuritet, ischemi, sepsis, acidosis, exponeringstid och anemi vilka alla förstärker det fria okonjugerade bilirubinets toxicitet (Loynachan et al, 2007). I litteraturen finns enligt författarens kännedom kernikterus beskrivet hos Gunn-råttor, rhesusapor, en kattunge, en vuxen hund med leversjukdom samt ett fåtal föl (Loynachan et al,

2007, Sangster et al 2007). De fall av kernikterus hos föl som finns beskrivna har alla troligtvis haft samband med neonatal isoerytolys.

Jämviktsdialys

Jämviktsanalys är en vanlig metod för mätning av proteinbindningsgrad. Den innebär att plasma och buffert med samma pH placeras på varsin sida av ett semipermeabelt membran. I plasman finns läkemedlet både obundet och bundet till plasmaproteiner. Det obundna läkemedlet kommer att diffundera ut ur plasman till bufferten tills en jämvikt inställt sig. Genom att sedan bestämma koncentrationen bunden TMP/SDZ (totalt – fritt) och dela denna med den totala koncentrationen TMP/SDZ erhålls proteinbindningsgraden (Ingvast-Larsson, personligt meddelande) (Figur 1).



Figur 1. Jämviktsdialys, principskiss. Endast det obundna och farmakologiskt aktiva läkemedlet tar sig över membranet.

I denna studie användes metoden för jämviktsdialys även för att bestämma mängden fritt okonjugerat bilirubin. Principen är densamma som för jämviktdialys för att bestämma proteinbindningsgrad. Bilirubinet i blodet är antingen konjugerat eller okonjugerat. Det konjugerade bilirubinet är bundet till glukuronsyra och bildar en så stor molekyl att det ej kan passera det semipermeabla membranet och stannar i plasman. Av det okonjugerade bilirubinet är 99 % bundet till albumin och kan således inte heller passera membranet varför enbart fritt okonjugerat bilirubin bör återfinnas i bufferten. Då man på institutionen för farmakologi och toxikologi inte tidigare använt jämviktdialys för bestämning av mängden bilirubin gjordes först ett försök där metoden och inställningar på mätutrustningen utprovades. Vid jämviktsdialys finns risken att det specifika ämnet man eftersöker binder till utrustningen och resultatet blir således otillförlitligt (Ingvast-Larsson, personligt meddelande).

MATERIAL OCH METODER

Hästarna

Sju stycken (fem hingstfölar och två stufölar) tre dagar gamla friska neonatala varmblodiga travarfölar behandlades intravenöst med trimetoprim/sulfadiazin^{a)} i doseringen 15 mg/kg q 12 h under tre dagar. En obehandlad kontrollgrupp på sju fölar matchade för ålder, ras och kön ingick i studien.

De behandlade fölarna vägdes dagligen och den injicerade volymen av TMP/SDZ korrigerades vid behov så att den alltid uppgick till 15 mg/kg. Blodprov för analys av P-albumin, P-totalprotein och P-bilirubin togs i heparinrör via permanentkateter^{b)} placerad i *vena jugularis* omedelbart innan försöket startade och därefter var 24:e timma under totalt fyra dygns tid. För analys av koncentrationen fritt bilirubin togs blodprov i heparinrör vid tidpunkten 45 minuter efter sista givan av TMP/SDZ och från kontrollgruppen dag tre i försöket. För analys av proteinbindningsgraden användes heparinrör och prov togs vid tidpunkterna fem minuter, 15 minuter samt 12 timmar efter den sista givan av TMP/SDZ. Permanentkatetrarna spolades igenom med fysiologisk NaCl efter administreringen av TMP/SDZ samt inför och efter varje provtagningstillfälle. Blod (5-10 ml) aspirerades i annan spruta innan det aktuella provet togs från permanentkatetern. Kontrollgruppens blodprover för analys av P-albumin, P-totalprotein och P-bilirubin togs via ett vacutainersystem vid motsvarande tidpunkter som för de behandlade fölarna, dvs var 24:e timma under levnadsdag tre tom sju. Försöket har fått godkännande från centrala försöksdjursnämnden, nr C122/7.

Analys av blodprover

Blodproverna centrifugerades och frystes ner till -20°C snarast efter provtagningstillfället. De analyserades med avseende på P-albumin, P-totalprotein, P-totalt bilirubin och P-konjugerat bilirubin på Konelab 30^{c)}. Den okonjugerade fraktionen bilirubin räknades ut som differensen mellan totalt och konjugerat bilirubin.

Proteinbindningsgrad – jämviktsdialys

Proteinbindningsgraden för TMP/SDZ i behandlingsgruppen analyserades med hjälp av jämviktsdialys. Plasma från de sju behandlade fölarna poolades för provtagningstidpunkterna fem minuter och 12 timmar efter sista givan TMP/SDZ så att ett poolat prov med hög koncentration TMP/SDZ och ett prov med låg koncentration erhöles. Proverna kördes i tripletter varför 6 kamrar användes till försöket. Bufferten bestod av 3,19 g Na₂HPO₄*2H₂O, 0,78 g NaH₂PO₄*H₂O samt 2,25 g NaCl som späddes till 1000 ml med destillerat vatten. pH i bufferten ställdes till 7,4 med hjälp av 1 M HCL samt 2 M NaOH. pH i plasma justerades med hjälp av ca 6 µl 1 M HCL per ml plasma till pH 7,4. Plasma samt buffert pipetterades ner i jämviktsdialyskamrar i lika volym (1,2 ml) och inkuberades i 37°C i ett skakande vattenbad under fem timmar. Därefter togs prov för analys av

TMP/SDZ vilka analyserades med vätskekromatografianalys (High Pressure Liquid Chromatography) på Dopinglaboratoriet, SVA, Uppsala.

För att kontrollera tiden till jämvikt användes prover tagna 15 minuter efter sista givan av TMP/SDZ. Dessa poolades och kördes i en jämviktsdialys där prover togs ut efter två, fyra, fem och sex timmar i inkubation. Proverna analyserades på dopinglaboratoriet och man fann att jämvikt erhöles efter fem timmar.

Analys av fritt bilirubin – jämviktsdialys

Jämviktsdialys av bilirubin utfördes principiellt på samma sätt som jämviktsdialysen för proteinbindningsgrad. För att först testa att metoden fungerar för bilirubin gjordes en jämviktsdialys där tid till jämvikt mättes. Plasma från fyra vuxna hästar användes i försöket. Plasman poolades och pH ställdes med hjälp av 1 M HCL till 7,4. Samma buffert som tidigare användes och pH i denna mättes till 7,4. Proverna kördes i dubletter och 10 kamrar användes. Prov togs ut vid 0, 2, 3, 4, 5, och 6 timmar. Jämvikt inställde sig redan efter 2 timmar. För att se om bilirubinet binder till utrustningen jämfördes koncentrationen bilirubin från 0-provet med koncentrationen bilirubin i provet taget vid 6 timmar och någon bindning till utrustningen sågs ej. För jämviktsdialysen togs plasma från de TMP/SDZ behandlade fölen 45 minuter efter sista givan av TMP/SDZ den tredje försöksdagen och från kontrollfölen dag tre. Samma buffert som tidigare användes och pH i buffert samt plasma ställdes till pH 7,4. Plasma samt buffert pipetterades ner i jämviktsdialyskamrar i lika volym (1,2 ml) och inkuberades i ett skakande vattenbad under fyra timmar. Prover togs därefter ut och analyserades med avseende på P-totalt bilirubin och P-konjugerat bilirubin. Den okonjugerade fraktionen bilirubin räknades ut som differensen mellan totalt och konjugerat bilirubin.

Analys av data

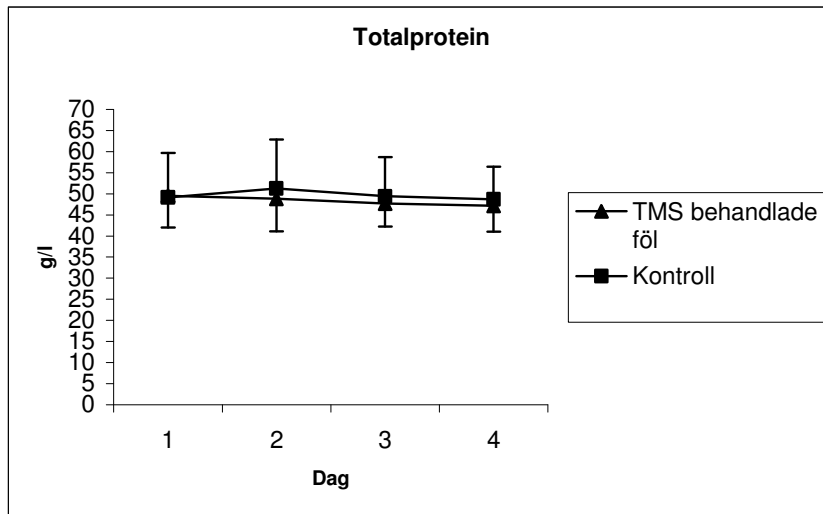
ANOVA användes för att studera om det förelåg skillnader i koncentration för totalprotein, totalbilirubin, konjugerat bilirubin och okonjugerat bilirubin mellan de båda grupperna av föl. Skillnader ansågs signifikanta vid $P < 0,05$. Data redovisas som medelvärdet \pm SD. Den statistiska analysen utfördes med hjälp av programmen Exel från Microsoft Corporation och Sigmastat från Systat Software Inc.

RESULTAT

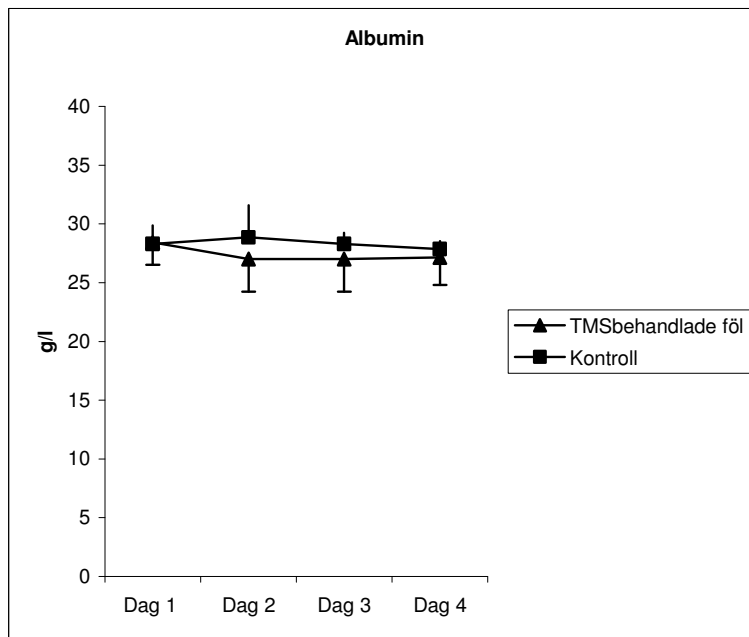
Serumkoncentration bilirubin

För koncentrationerna totalprotein, albumin, totalbilirubin, konjugerat bilirubin och okonjugerat bilirubin i plasma sågs inga signifikanta skillnader mellan den TMP/SDZ-behandlade gruppen och kontrollgruppen (Figur 3-7). För bilirubin finns en tendens att nivåerna sjunker med tiden, men det fanns ingen signifikant skillnad mellan de TMP/SDZ-behandlade fölen och kontrollfölen. För totalt bilirubin ses signifikanta skillnader mellan nivåerna dag ett jämfört med dag tre och dag fyra samt dag två jämfört med dag fyra. För konjugerat bilirubin ses en signifikant skillnad i koncentrationen mellan dag två och fyra. För okonjugerat

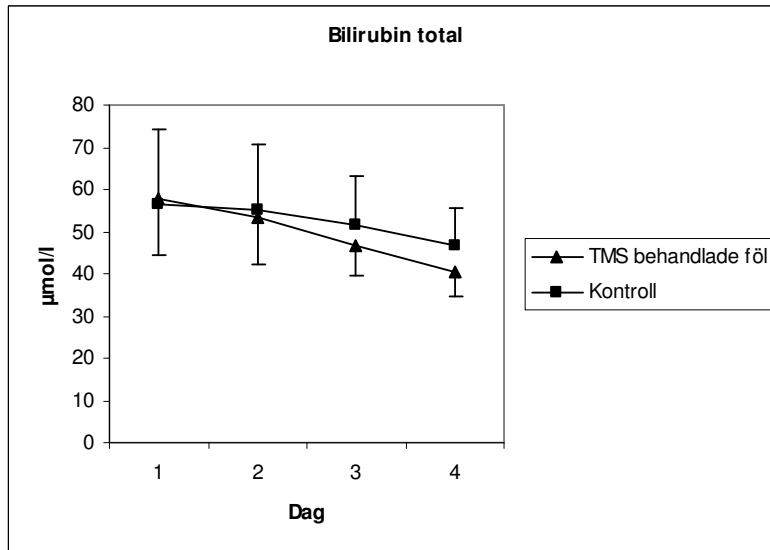
bilirubin ses signifikanta skillnader mellan dag ett och dag tre samt dag ett och fyra och dag fyra. (Figur 5-7).



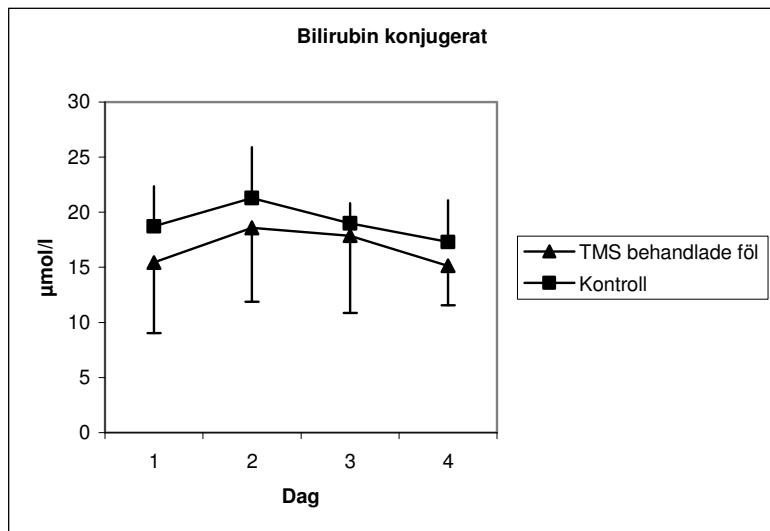
Figur 3. Koncentrationen totalprotein (g/l) i plasma hos föl behandlade med trimetoprim/sulfadiazin jämfört med en obehandlad kontrollgrupp.



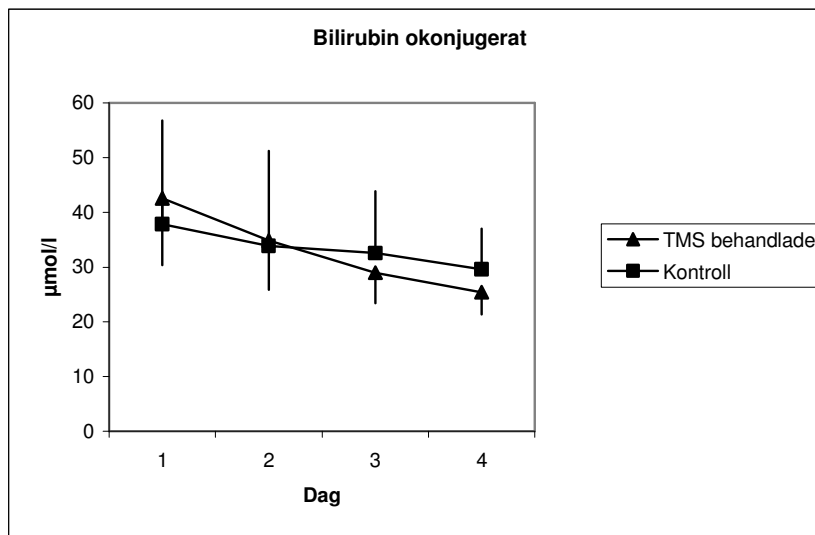
Figur 4. Koncentrationen albumin (g/l) i plasma hos föl behandlade med trimetoprim/sulfadiazin jämfört med obehandlad kontrollgrupp.



Figur 5. Koncentrationen totalt bilirubin (g/l) i plasma hos föl behandlade med trimetoprim/sulfadiazin jämfört med obehandlad kontrollgrupp.



Figur 6. Koncentrationen konjugerat bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) i plasma hos föl behandlade med trimetoprim/sulfadiazin jämfört med en obehandlad kontrollgrupp.



Figur 7. Koncentrationen okonjugerat bilirubin ($\mu\text{mol/l}$) i plasma hos föl behandlade med trimetoprim/sulfadiazin jämfört med en obehandlad kontrollgrupp.

Plasmaproteinbindningsgrad bilirubin

Vid analys av fritt okonjugerat bilirubin hos alla föl erhöles ej mätbara nivåer bilirubin i bufferten.

Plasmaproteinbindningsgrad trimetoprim/sulfadiazin.

Plasmaproteinbindningsgraden för trimetoprim och sulfadiazin analyserades till 23 % respektive 14 %.

DISKUSSION

Då totalprotein, albumin och bilirubin för fölen (medelvärde för alla föl i studien vid fem dagars ålder) jämförs med referensvärden för vuxna hästar (Kaneko och Harvey, 2008) ses skillnader. Totalproteinnivåerna ligger högre hos vuxna hästar jämfört med fölen i denna studie. Albuminnivåerna hos fölen i studien överrenstämmer ganska bra med referensvärdena från vuxna hästar. Detta stämmer även väl med Caprile och Shorts (1987) åsikt att den hypoalbuminemi som ofta ses hos neonatala djur endast är marginell hos föl. Bilirubinnivåerna ligger högre hos fölen än hos de vuxna hästarna. Vid en jämförelse av bilirubinkoncentrationen mellan alla 14 föl i studien vid fem dagars ålder mot referensvärden från fem dagar gamla föl ses inga större avvikelser. Bilirubinprofilen hos fölen med höga bilirubinnivåer som sjunker med tiden stämmer väl överens med den övergående hyperbilirubinemi som ses hos föl under neonatalperioden (Bauer et al. 1989).

Jämviktsanalysen för bilirubin visade på icke mätbara värden av fritt okonjugerat bilirubin hos alla föl. Att nivåerna var väldigt låga för kontrollfölen torde vara helt normalt eftersom det normalt bara är en väldigt liten del av bilirubinet som är fritt. I en opublicerad studie av Lamola, redovisad av Wells och medarbetare (1982), tillsattes bilirubin i koncentrationen 10260 $\mu\text{mol/l}$ till plasma från en vuxen människa. Lösningen filtrerades genom ett ultrafilter som ej släppte igenom bilirubin bundet till plasmaproteiner och därefter uppgick koncentrationen bilirubin bara till 86 $\mu\text{mol/l}$ i filtratet, vilket visar på bilirubins höga proteinbindningsgrad. Att nivåerna fritt okonjugerat bilirubin även var låga för de TMP/SDZ-behandlade fölen tyder på att TMP/SDZ-behandlingen inte ökat risken för hyperbilirubinemi och därmed inte ökar risken för kernikterus. Att mäta koncentrationen fritt okonjugerat bilirubin är inget som man normalt gör på vanliga laboratorier och metoden som använts i denna studie är lite väl omständlig för att användas rutinmässigt. Koncentrationen fritt okonjugerat bilirubin har dock en direkt korrelation till totalbilirubin varför totalbilirubin borde kunna användas för att värdera risken för hyperbilirubinemi och kernikterus (Bender et al. 2007). Att ha ett gränsvärde för då totalbilirubin är så högt att det finns en risk för kernikterus vore praktiskt men något erkänt sådant värde finns dock ej idag. I en studie på 72 föl med Neonatal isoerytolys visade sig 462 $\mu\text{mol/l}$ vara ett bra tröskelvärde för att förutsäga om ett föl ska drabbas av kernikterus eller ej. Risken för ett föl med totalbilirubin $\geq 462 \mu\text{mol/l}$ att drabbas av kernikterus var 17 gånger större än för ett föl med totalbilirubin $< 462 \mu\text{mol/l}$ (Polkes et al. 2008). Det ska dock nämnas att materialet i denna studie endast bestod av sex föl.

Proteinbindningsgraden för Trimetoprim samt Sulfadiazin uppmättes till 23 % respektive 14 %. Dessa värden ligger lite lägre än de värden Gustafson et al. uppmätte i sin studie 1999. Där var proteinbindningsgraden 35 % för Trimetoprim och 20 % för Sulfadiazin, men denna studie utfördes på vuxna hästar. Tolkningen av proteinbindningsgraden måste dock göras med lite försiktighet då proverna från jämviktsdialysen för TMP/SDZ tyvärr tinades under förvaringen innan analysen. Hur upptiningen skulle kunna ha påverkat proverna är osäkert men för att säkert kunna lita på provsvaren och därmed resultaten borde jämviktsdialysen göras om i en eventuellt framtida studie.

Resultat från denna studie visar att nivåerna totalt-, konjugerat- samt okonjugerat bilirubin inte påverkas av behandling med TMP/SDZ. Proteinbindningsgraden visade sig vara lägre hos fölen än hos vuxna hästar både för trimetoprim och sulfadiazin, vilket innebär att risken för displacement torde vara lägre för fölen. Dessa iakttagelser samt det faktum att inga kliniska rapporter finns om kernikterus på föl i samband med trimsulfabehandling innebär således att dagens dosering bör vara säker att använda med avseende på displacement av bilirubin och kernikterus. Det skall dock nämnas att fölen i studien var minst tre dagar gamla då studien startade vilket innebär att de var sju dagar gamla då de sista proverna togs. Då föl har en relativt snabb neonatalutveckling är det möjligt att resultaten sett annorlunda ut om försöken inletts då fölen var ännu yngre. Exempelvis når bilirubinnivåerna sitt maximum redan de första 48 timmarna och utsöndringen av bilirubin går långsamt framför allt under de första fem dygnen (Becht & Senrad, 1985).

Alla föl i studien var även kliniskt friska. Det är känt att sjukdom påverkar farmakokinetiken hos olika läkemedel. Feber ger en ökad distributionsvolym och pH påverkar distributionsvolymen eftersom det framför allt är icke-joniserade substanser som passerar cellulära membran. Vid metabolisk acidosis, som kan ses i samband med septikemi, ökar distributionsvolymen för sura läkemedel som TMP/SDZ (Vaala, 1985). Det vore därför intressant att gå vidare med studier på yngre föl samt föl som behandlas på klinik för sepsis.

Vid fortsatta studier bör även en hematologisk status tas på fölen. Föls erythrocyter är inte bara känsliga för bilirubins toxiska effekter utan är även extra känsliga för oxidativa effekter. Detta gör att behandling med sulfonamider som framför allt metaboliseras via oxidation kan skada erythrocyterna och leda till hemolys och methemoglobinemi (Caprile and Short, 1987). Det vore därför intressant att jämföra den röda blod bilden mellan föl behandlade med TMP/SDZ och obehandlade föl.

Trimetoprim/sulfonamid (TMS) används i Sverige ofta i samband med sepsis hos föl. Vårt resistensläge för TMP/SDZ i samband med sepsis är relativt gott varför man kan rekommendera TMP/SDZ som förstahandsval i kombination med bensylpenicillin (Johansson, 2006). Man bör dock vara medveten om att resistensen hos *E. coli* mot Trimetoprim-sulfonamider generellt hos häst har ökat från 2 % 1992-1994 till 15 % på mitten av 90-talet, troligtvis på grund av ökad användning då orala preparat introducerats på den Svenska marknaden. Utskrivningen av TMS ökar för varje år och därmed även risken för ökad resistens (SVARM, 2007). Som kliniker bör man därför tänka till och inte skriva ut de orala preparaten bara för att det är enklare för djurägaren att administrera, utan endast då bredspektrumantibiotika är indikerat.

Ett alternativ till att använda TMP/SDZ vid neonatal sepsis är att använda bensylpenicillin i kombination med en aminoglykosid. Aminoglykosider har dock några egenskaper som ger dem nackdelar vid behandlingen av neonatal sepsis hos föl. Den allvarligaste nackdelen med aminoglykosider är att de är njurtoxiska. Att administrera ett känt njurtoxiskt preparat till ett neonatalt föl med eventuellt redan nedsatt njurfunktion är inte optimalt. Vid behandling med aminoglykosider bör läkemedelsnivåerna monitoreras i blodet för att få koncentrationer i blodet som är verksamma men ger så lite toxisk effekt som möjligt (Caprile and Short, 1987).

Att ständigt ta prover och analysera aminoglykosidnivåerna under en behandling är dock både tidskrävande och dyrt. En annan nackel med aminoglykosider är att de inte passerar blod-hjärnbarriären vilket är en fördel vid neonatal septikemi då meningit är en känd komplikation (Caprile and Short, 1987).

KONKLUSION

Resultaten i denna studie, samt den kliniska erfarenheten med avsaknad av rapporterade fall av kernikterus på föl i samband med trimetoprim/sulfadiazinbehandling, tyder på att den dosering av trimetoprim/sulfadiazin som idag används inte ökar risken för bilirubin-displacement och kernikterus hos neonatala föl.

TACK TILL

Först vill jag tacka min handledare Johan Bröjer och Katarina Schuback för all hjälp med provtagning av fölen i våras och Johan för hans hjälp med den teoretiska delen av arbetet. Ett stort tack även till Carina Ingvast-Larsson och Agneta Boström som tålmodigt svarat på alla mina frågor under laborationerna. Tack till Annemarie Ljungberg, Inger Lilliehöök och Bernt Jones för hjälp med analyserna på institutionen för klinisk kemi. Sist men absolut inte minst vill jag tacka Västerbo Stuteri som ställde upp med sina föl till studien!

Fotnoter

- a) Hippotrim® vet, injektionsvätska, lösning 200 mg/ml + 40 mg/ml, Bayer
- b) Mila permanentkateter, MILACATH. ®. 16ga x 7,5 cm,. MILA International inc.
- c) Konelab 30, Thermo Scientific.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Baggot, J.D och Short, C.R. 1984. Drug disposition in the neonatal animal, with particular reference to the foal. *Equine Veterinary Journal*. 16:364-367.
- Baggot, J.D. 1994. Drug therapy in the neonatal foal. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 10: 87-107.
- Baggot, J.D. 1997. Drug therapy in the neonatal animal. Principles of drug disposition in domestic animals: The Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. W.B Saunders Company. 219-224
- Bauer, J.E, Asquith, R.L, Kivipelto, M.S. 1989. Serum biochemical indicators of liver function in neonatal foals. *American Journal of Veterinary Research*. 50: 2037-2041.
- Bauer, J.E. 1990. Normal blood chemistries. In: *Equine Clinical Neonatology*. Editors: Koterba, A.M, Drumond, W.H, Kosch, P.C. Lea &Febiger. 608.
- Becht, J.L. and Semrad, S.D. 1985. Hematology, Blod Typing, and Immunology of the Neonatal Foal. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 1: 91-114.
- Bender, G.J, Cashore, W.J, Oh, W. 2007. Ontogeny of Bilirubin-Binding capacity and the Effect of clinical Status in Premature Infants Born at Less Than 1300 Grams. *Pediatrics*. Vol 120, Nr 5:1067-1074.
- Brewer, B.D och Koterba, A.M. 1988. Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Veterinary Journal*. 20:18-22.
- Brito, M.A. Rui, F.M. Silva, D.B. 2006. Bilirubin toxicity to human erythrocytes: A review. *Clinica Chimica Acta* 374: 46-56.
- Brodie, B.B. 1965. Displacement of one drug by another from carrier or receptor sites. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 58:946-55.
- Brumbaugh G.W, Martens R.J, Knight H.D, Martin, M.T. 1983. Pharmacokinetics of chloramphenicol in the neonatal horse. *Journal of Veterinary Pharmacological Theory*. 6: 219-227.
- Burrows, G.E, Barto, P.B, Martin B, Tripp, M.L. 1983. Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: cloramphenicol, lincomycin and tylosin. *American Journal of Veterinary Research*. 44:1053-1057.
- Caprile, K.A. and Short, C.R. 1987. Pharmacologic considerations in Drug Therapy in Foals. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 3: 122-144.
- Corley K, Furr M. 2003. Evaluation of a score designed to predict sepsis in foals. *Journal of veterinary emergencies and critical care*. 13:149-155.
- Furr, M. 2003. Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Antimicrobial Therapy. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol 2, no 1 : 3-8.
- Greenberg, D.A. 2002. The jaundice of the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 99. No 25: 15837-15839.
- Gustafsson, A, Båverud, V, Franklin, A, Gunnarsson, A, Ögren, G. and Ingvast-Larsson, C. 1999. Repeated administration of trimethoprim/sulfadiazine in the horse – pharmacokinetics, plasma protein binding and influence on the intestinal microflora. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 22: 20-26.
- Henry-Barton, M, 2006. Septicemia. *Equine Neonatal Medicine*. Editor: Paradis, M.R. Elsevier Inc. 75-97.

- Hillman, N. 2007. Hyperbilirubinemia in the Late Preterm Infant. *Newborn & Infant Nursing Reviews*. Vol 7. 2: 91-94
- Hjalmarson Vertovec, Romana (2007) Enkel intravenös administrering av trimetoprim-sulfadiazin hos neonatala föl. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:63.
- Ingvast-Larsson, C. Personligt meddelande. November 2008.
- Johansson, I. 2006. Bakteriella isolat, antibiotikaresistens och överlevnad hos föl med septikemi. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet)
- Kami, G, Merritt, A.M, Duelly, P. 1984. Preliminary studies of plasma and extracellular fluid volume in neonatal ponies. *Equine veterinary journal* 16:356-358.
- Kaneko and Harvey. 2008. Appendix VIII Blood Analyte Reference Values in Large Animals. *Clinical Biochemistry of Domestic animals*. 6nd edition. Elsevier inc.
- Klammt, S, Mitzner S.R, Stange, J, Loock, J, Heemann, U, Emmrich, J, Reisinger, E.C and Schmidt, R. 2008. Improvement of Impaired Albumin Binding Capacity in Acute-on-chronic Liver Failure by albumin Dialysis. *Liver transplantation*. 14:1333-1339.
- Koterba, A.M, Brewer, B.D, Tarplee, F.A. 1984. Clinical and clinicopathological characteristics of the septicaemic neonatal foal: Review o 38 cases. *Equine vet J*. 16: 376-383.
- Koterba, A.M, and House, J.K. 1996. Neonatal infection. In: *Large animal internal medicine*. 2nd edition. Editor: Smith B.P. 344-353
- Magdesian, K.G. 2003. Neonatal Pharmacology and Therapeutics. In: *Current therapy in equine medicine 5*. Editor Robinson, E.N. Elsevier Science.
- Paradis, M.R. 1994. Update on neonatal septicemia. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 10: 109-135.
- Paradis, M.R. 1997. Neonatal Septicemia. In: *Current therapy in equine medicine 4*. Editor: Robinson, E.N. WB Saunders company.
- Plumb, D.C. 2008. *Plumb's Veterinary drug handbook*. 6th edition. Blackwell Publishing Professional.847-848.
- Polkes, A.C, Giguère, S, Lester G.D & Bain, F.T. 2008. Factors Associated with Outcome in Foals with Neonatal Isoerythrolysis (72 Cases, 1988-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22: 1216-1222
- Reed, S.M, Bayly, W.M and Sellon, D.C. 2004. *Equine internal medicine*. 2nd edition. Elsevier-Saunders. 1397-1400.
- Robinson, J. A, Allen, G.K, Green, E.M, Fales, W.H, Loch, W.E and Wilkerson C.G.1993. A prospective study of septicaemia in colostrum-deprived foals. *Equine veterinary journal*. 25: 214-219
- Sangster, C. R., Stevenson, C. K, Kidney, B. A, Montgomery D. L and Allen A. L. 2007. Kernicterus in an Adult Dog. *Veterinary pathology*.
- Silverman W.A, Fertig J.W, Berger A.P. 1956. A difference in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regimens. *Pediatrics*. 18:614-624.

- Smith, L.J, Marr, C.M, Payne, R.J, Stoneham, S.J, Reid, S.W. 2004. What is the likelihood that Thoroughbred foals treated for septic arthritis will race? *Equine Veterinary Journal*. 36: 452-6.
- Spoo, J.W. and Riviere, J.E. 2001. Sulfonamides. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Editor Adams, R.H, Iowa State University Press. 797-819.
- SVARM 2007, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2008.
- Vaala, W.E. 1985. Aspects of Pharmacology in the Neonatal Foal. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 1: 51-75.
- Watchko, J.F. and Maisels, M.J. 2003. *Archive of Diseases in Childhood, Fetal and Neonatal Edition*. 88: 455-458.
- Wells, R, Hammond, K, Lamola, A.A, Blumberd, W.E. 1982. Relationships of Bilirubin Binding Parameters. *Clinical Chemistry*. Vol 28. 3: 432-439.