



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär administration av bensylpenicillinprokain till häst



Amelie Lind

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:16*

Plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär administration av bensylpenicillinprokain till häst

Plasma concentration-time profile of penicillin G following intramuscular administration of procaine penicillin G in the horse

Amelie Lind

Handledare: Lena Olsén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Carina Ingvast Larsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Jonas Tallkvist, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:16

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bensylpenicillinprokain, prokain, bensylpenicillin, Penovet, häst, plasmakoncentration, farmakokinetik, dos, penicillinchock, prokaintoxicitet

Key words: Procaine penicillin G, procaine, benzylpenicillin, Penovet, horse, plasma concentration-time profile, plasma concentration, pharmacokinetics, dose, penicillin shock, procaine toxicity

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Bensylpenicillin är den mest använda antibiotikan inom svensk veterinärmedicin. Aktiviteten är god mot många vanliga grampositiva bakterier och ringa mot de flesta gramnegativa bakterier. Bensylpenicillin är ett förstahandsval vid många infektioner hos hästar och driver resistensutvecklingen i mer begränsad omfattning än antibiotika som har ett bredare antibakteriellt spektrum. I Sverige finns bensylpenicillin till häst godkänt i två olika beredningsformer: bensylpenicillinprokain (pc-prok) för intramuskulär injektion och bensylpenicillinnatrium (pc-na) för intravenös injektion. Fördelarna med pc-prok är att det kan administreras av djurägaren och att läkemedlet absorberas så långsamt från injektionsplatsen att halveringstiden ($T_{1/2}$) förlängs avsevärt, vilket innebär att det behöver administreras endast en gång per dygn. Prokain är dock associerat med den mest välkända biverkningen av penicillinprokain hos häst, så kallad penicillinchock, som i vissa fall är mycket allvarlig.

Plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär administration av pc-prok har studerats tidigare. De flesta studier är dock gamla och få har utförts på de preparat som används i Sverige idag. Syftet med denna studie var att fastställa plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär injektion av pc-prok (Penovet® vet.) till häst, i den dos som rekommenderas av tillverkaren. Plasmakoncentration-tidsprofilen relaterades till *minimum inhibitory concentration* (MIC) hos vanliga penicillinkänsliga patogener för att säkerställa en relevant doseringsrekommendation för Penovet® vet.

Åtta friska varmblodiga travare injicerades intramuskulärt med 21 mg pc-prok per kg kroppsvikt en gång dagligen under fyra dygn. Blodprover för analys av bensylpenicillinkoncentrationen i plasma togs innan och 12 timmar (h) efter varje injektion, samt mer frekvent efter sista injektionen.

Den maximala koncentrationen (C_{max}) var 2656 ± 503 ng/ml och nåddes $4 \pm 1,1$ h efter den sista injektionen. $T_{1/2}$ var $11,36 \pm 3,64$ h. *Area under curve* (AUC) var 33330 ± 8293 h·ng/ml. Den minsta koncentrationen (C_{min}), 24 h efter varje injektion, var 456 ± 126 ng/ml. För god antibakteriell effekt bör den fria plasmakoncentrationen (fC) överstiga MIC under minst 30-50% av dosintervallet. Efter sista injektionen var tiden över MIC ($fT > MIC$) $231\% \pm 49$ för betahemolyserande streptokocker (MIC 30 ng/ml), $136\% \pm 22$ för *Staphylococcus aureus* (MIC 120 ng/ml) och $6\% \pm 9$ för *Actinobacillus equuli* (MIC 1000 ng/ml).

Konklusionen är att Penovet® vet. i den dos som rekommenderas av tillverkaren ger en plasmakoncentration av bensylpenicillin som är mer än tillräckligt hög för att behandla infektioner med flera vanliga penicillinkänsliga patogener hos häst, däribland betahemolyserande streptokocker och *S. aureus*. Koncentrationen är dock i många fall för låg för att behandla *A. equuli* och andra *Actinobacillus* spp. Dosen skulle troligen kunna sänkas med bibehållen god effekt mot många vanliga penicillinkänsliga patogener. En förhoppning finns om att en lägre dosering kan innebära en minskad risk för penicillinchock på grund av prokaintoxicitet.

SUMMARY

Penicillin G is the most used antibiotic in veterinary medicine in Sweden. The activity against many gram-positive bacteria is excellent, while the majority of gram-negative bacteria are naturally resistant. Penicillin G is the first choice for many infections in the horse and is considered less likely to select for antibiotic resistance compared to broad-spectrum antibiotics. Two different dosage forms of penicillin G for horses are available in Sweden: procaine penicillin G for intramuscular injection and penicillin G sodium for intravenous injection. The benefits of procaine penicillin G are that the horse owner can administer it, and that it is absorbed slowly which makes the half-life and therefore dosing interval considerably longer. Administration once a day is considered enough. Unfortunately, the procaine is associated with the most well-known and sometimes very serious side effect of procaine penicillin G, the so called penicillin shock.

The plasma concentration-time profile of penicillin G following intramuscular administration of procaine penicillin G have been studied before. Most studies are old and few have been done on the preparations that are available in Sweden today. The objective of the present study was to determine the plasma concentration-time profile of penicillin G following intramuscular administration of procaine penicillin G (Penovet® vet.) in the horse, in the dose recommended by the manufacturer. This was related to the minimum inhibitory concentration (MIC) of common penicillin sensitive bacteria to ensure an up to date dosing regimen of Penovet® vet.

Eight healthy standard bred trotters were injected intramuscularly with 21 mg/kg body weight of procaine penicillin G (approximately 21 000 IU) once daily for four days. Blood samples were taken before and 12 hours after every injection, and more frequent samples were taken after the last injection. The samples were analysed for plasma penicillin G levels.

The maximal plasma concentration (C_{max}) was 2656 ± 503 ng/ml and it was reached $4 \pm 1,1$ hours after the last injection. The half-life ($T_{1/2}$) was $11,36 \pm 3,64$ hours. The area under the curve (AUC) was 33330 ± 8293 h·ng/ml. The trough plasma concentration (C_{min}) 24 hours after each injection was 456 ± 126 ng/ml. The free plasma concentration (fC) should be above MIC for at least 30-50% of the dosing interval to ensure adequate antimicrobial activity. Following the last injection, the time above MIC ($fT > MIC$) was $231\% \pm 49$ for beta haemolytic streptococci (MIC 30 ng/ml), $136\% \pm 22$ for *Staphylococcus aureus* (MIC 120 ng/ml) and $6\% \pm 9$ for *Actinobacillus equuli* (MIC 1000 ng/ml).

The conclusion is that Penovet® vet. in the recommended dose provides plasma concentrations in the horse that are more than enough to treat infections with common penicillin sensitive bacteria, including beta haemolytic streptococci and *S. aureus*. However, the concentrations are too low to treat infections with many isolates of *A. equuli* and other *Actinobacillus* spp. The dose could probably be reduced without reducing the effect against many common penicillin sensitive bacteria. Hopefully, a reduced dose could mean a reduced risk of penicillin shock due to procaine toxicity.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
SYFTE	2
LITTERATURÖVERSIKT	2
PENICILLINER	2
<i>Beredningsformer av bensylpenicillin</i>	2
<i>Biverkningar</i>	3
FARMAKOKINETIK OCH FARMAKODYNAMIK	4
<i>PK/PD-index</i>	5
BENSYLPENICILLINPROKAINETS FARMAKOKINETIK HOS HÄST	5
<i>Plasmakoncentration-tidsprofilen efter intramuskulär injektion</i>	6
<i>Proteinbindningsgrad</i>	6
<i>Doseringsrekommendationer</i>	6
MIC FÖR VANLIGA PATOGENER HOS HÄST	7
MATERIAL OCH METODER	8
HÄSTAR	8
FÖRSÖKSUPPLÄGG	8
BLODPROV	9
ANALYS AV BENSYLPENICILLIN	10
PK/PD-ANALYS	10
<i>Halveringstid ($T_{1/2}$)</i>	10
<i>C_{12h} och minsta plasmakoncentrationen (C_{min})</i>	10
<i>Area under curve (AUC_{0-24h})</i>	10
<i>Fri plasmakoncentration (fC)</i>	11
<i>Tiden över MIC ($fT > MIC$)</i>	11
RESULTAT	12
FARMAKOKINETIK	13
TIDEN ÖVER MIC ($fT > MIC$)	13
DISKUSSION	15
<i>Plasmakoncentration-tidsprofil</i>	15
<i>Tiden över MIC ($fT > MIC$)</i>	17
<i>Generaliserbarhet</i>	18
<i>Doseringsrekommendation</i>	19
<i>Biverkningar</i>	21
KONKLUSION	21
TACK	21
REFERENSER	22

FÖRKORTNINGAR

AUC	<i>Area under curve</i> (arean under kurvan)
C_{\max}	Maximala plasmakoncentrationen
C_{\min}	Minsta plasmakoncentrationen (24 h efter varje injektion)
fC	Fria (icke proteinbundna) plasmakoncentrationen
$fT > MIC$	Tiden över MIC (fri plasmakoncentration)
h	Timmar
IU	<i>International Units</i> (internationella enheter)
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (minsta inhiberande koncentration)
pc-na	Bensylpenicillinnatrium
pc-lido	Bensylpenicillinnatrium med lidokain och adrenalin
pc-prok	Bensylpenicillinprokain
PD	Farmakodynamik
PK	Farmakokinetik
PK/PD	Farmakokinetik och farmakodynamik
q	Doseringsintervall
SVA	Statens Veterinärmedicinska Anstalt
T_{\max}	Tiden för C_{\max}
$T_{1/2}$	Halveringstid

INLEDNING

Bensylpenicillinets antibakteriella egenskaper upptäcktes 1928 av Alexander Fleming, och redan på 1940-talet användes det till häst (Fleming, 1929; Doll & Dimock, 1946). Bensylpenicillin, även kallat penicillin G, är än idag den mest använda antibiotikan inom svensk veterinärmedicin (Swedres-Svarm, 2014). Bensylpenicillin har god aktivitet mot flera vanliga grampositiva patogener som orsakar infektioner hos häst, till exempel *Staphylococcus aureus* och betahemolyserande streptokocker (Prescott, 2013a). Aktiviteten är ringa mot gramnegativa bakterier. Därför anses bensylpenicillin selektera för resistens i mindre utsträckning än antibiotika med aktivitet även mot gramnegativa bakterier.

Bensylpenicillin till häst finns godkänt i två olika former i Sverige: pc-prok för intramuskulär administration och pc-na för intravenös (Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011b). Fördelarna med pc-prok är att det kan ges av djurägaren och att det endast behöver ges en gång om dagen, medan pc-na behöver ges 3-4 gånger per dag (Horspool & McKellar, 1995). Penicilliner anses generellt vara säkra läkemedel, men hos hästar förekommer bland annat centralnervösa symptom vid giva av bensylpenicillin, så kallad ”penicillinchock” (Chapman *et al.*, 1992; Olsén *et al.*, 2007). Det är troligen vanligare vid användning av pc-prok än pc-na och anses i de flesta fall bero på prokaintoxicitet. Penicillinchock kan vara mycket dramatiskt och dödsfall förekommer, vilket kan göra djurägare och veterinärer känner sig osäkra inför att använda läkemedlet och undviker det. Det finns anledning att tro att förekomsten och allvarlighetsgraden av prokaintoxicitet är dosberoende (Tobin *et al.*, 1977a; Chapman *et al.*, 1992). Utifrån detta perspektiv skulle det vara positivt om doseringsrekommendationen kunde minskas med bibehållen god antimikrobiell effekt.

Optimal dosering och doseringsintervall av antibiotika är viktigt för att uppnå god behandlingseffekt, minimera biverkningar och minimera risken för resistensutveckling (Drusano, 2004). Den dos av pc-prok som rekommenderas i FASS® vet är 20-21 mg/kg intramuskulärt en gång dagligen (Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011c). I litteraturen finns olika doseringsrekommendationer. Till exempel rekommenderar Plumb (2011) 20 000 – 50 000 IU/kg (ca 20-50 mg/kg) två gånger per dygn (q 12 h) och Giguère & Afonso (2013) 25 000 IU/kg (ca 25 mg/kg), q 12 h. Till grund för dosrekommendationer ligger undersökningar av plasmakoncentration-tidsprofilen. De flesta studier är från 1980- och 1990-talet eller äldre och idag finns mer precisa analysmetoder och större kunskaper om antimikrobiell farmakokinetik och farmakodynamik (Lee & Kerns, 1999; Drusano, 2004). Tidsprofilen varierar med beredningsformen av pc-prok (olika produkter har till exempel ofta olika hjälpämnen), och få studier har gjorts på Penovet® vet., som är ett av två godkända preparat till häst i Sverige. För att kunna ge doseringsrekommendationer relateras ett antibiotikums farmakokinetik med farmakodynamik-parametern MIC för aktuella patogener. Eftersom MIC varierar mellan olika bakteriearter, bör dos väljas i förhållande till MIC som är vanligt förekommande i den population man behandlar – något som alltså kan variera mellan olika tidpunkter och platser i världen. Det finns följaktligen flera anledningar att på nytt undersöka plasmakoncentration-tidsprofilen för en beredningsform som används i Sverige idag.

Syfte

Syftet med denna studie är att fastställa plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär injektion av pc-prok (Penovet® vet.) till häst, i den dos som rekommenderas av tillverkaren. Detta relateras till MIC hos vanliga penicillinkänsliga patogener för att fastställa $fT > MIC$, för att säkerställa en relevant doseringsrekommendation för Penovet® vet. Studien är en del av ett större forskningsprojekt om bensylpenicillin till häst.

LITTERATURÖVERSIKT

Penicilliner

Penicilliner är en grupp betalaktamantibiotika som verkar genom att hämma bakteriens cellväggssyntes (Prescott, 2013a).

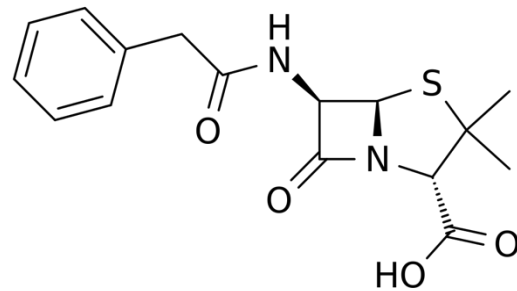
Bensylpenicillin är den betalaktam som först upptäcktes. Effekten är baktericid men det är framför allt växande bakterier som genomgår

lysis. Aktiviteten hos bensylpenicillin är god mot många grampositiva bakterier, däribland betahemolyserande streptokocker och stafylokocker utan förvärvad resistens. Mot de flesta gramnegativa arter, exempelvis enterobacteriaceae, är aktiviteten otillräcklig. Penicilliner utsöndras snabbt och oförändrad via njurarna, vilket resulterar i höga urinkoncentrationer. $T_{1/2}$ efter intravenös injektion av pc-na är kort, ca 40-50 minuter (Dürr, 1976; Love *et al.*, 1983; Horspool & McKellar, 1995). Bensylpenicillin uppnår koncentrationer i bukvätska och synovia som är ungefär hälften av den i serum (Stover *et al.*, 1981), men passerar biologiska membran dåligt vilket ger låga koncentrationer bland annat i mjölk (Prescott, 2013a).

Olika penicilliner skiljer sig åt avseende vilken sidokedja de har (Prescott, 2013a). Sidokedjan avgör penicillinets antibakteriella spektrum samt hur känslig den är för betalaktamaser. Betalaktamaser är enzymer som produceras av vissa bakterier och som bryter ned betalaktamantibiotika, och bakterier som producerar betalaktamaser är därmed resistenta mot bensylpenicillin. Denna typ av resistens förekommer bland annat hos *Staphylococcus aureus*. Vissa andra penicilliner är mer eller mindre stabila för betalaktamaser, till exempel temocillin. En annan resistensmekanism är methicillinresistens som även den förekommer hos *S. aureus* (MRSA). Bakterier som är methicillinresistenta klassas som resistenta mot alla betalaktamantibiotika.

Beredningsformer av bensylpenicillin

Som tidigare nämnts finns två olika former av bensylpenicillin godkända till häst i Sverige: pc-na och pc-prok (Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011b). Pc-na ges intravenöst och administreras därför endast av veterinär och djursjukskötare. Eftersom $T_{1/2}$ är kort rekommenderas att pc-na ges 3-4 gånger om dagen (Horspool & McKellar, 1995; Giguère & Afonso, 2013).



Figur 1: Strukturformel för bensylpenicillin.
Brenton Horne, Creative Commons.

Pc-prok ges intramuskulärt och kan därmed ges av djurägaren. Pc-prok är ett svårslösligt salt av prokain och bensylpenicillin (Sullivan *et al.*, 1948; se Tobin *et al.*, 1977b). Vid intramuskulär injektion dissocierar saltet långsamt, varpå substanserna absorberas till blodet. Detta långsamma upptag förlänger $T_{1/2}$ avsevärt, vilket gör att administrering en gång om dagen vanligen är tillräckligt. Den långsamma absorptionen gör även att C_{max} blir lägre än för pc-na. Prokain är även ett lokalanestetikum, vilket minskar smärta vid injektionsplatsen. Pc-prok är alltså på många sätt mycket användbart. Två olika preparat av pc-prok finns registrerade för häst i Sverige: Penovet® vet. och Ethacilin® vet. (Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011c).

Penicillin lämpar sig inte för peroral administrering till häst (Prescott, 2013a). Den orala biotillgängligheten för bensylpenicillin är låg och att risken för gastrointestinala biverkningar i form av kolik och diarré är stor (Baggot *et al.*, 1990; Horspool & McKellar, 1995). Den låga orala biotillgängligheten beror delvis på att bensylpenicillin är känsligt för syra, och bryts ner i den sura miljön i magsäcken (Prescott, 2013a). Fenoximetylpenicillin, eller penicillin V, är däremot syrastabilt (Plumb, 2011). Det krävs dock höga doser samt att hästarna fastas innan givan för att uppnå tillräckligt höga plasmakoncentrationer (Schwark *et al.*, 1983; Ducharme *et al.*, 1983). Fenoximetylpenicillin finns inte registrerat för användning till djur i Sverige.

Biverkningar

Penicilliner är generellt sett säkra läkemedel och har ett brett terapeutiskt fönster (Prescott, 2013a). Det förekommer dock biverkningar. Hos hästar ses bland annat allergiska reaktioner mot penicillin (urtikaria, angioödem eller anafylaktisk chock) och lokala reaktioner vid injektionsplatsen vid intramuskulär injektion (Tjälve, 1997; Olsén *et al.*, 2007; Prescott, 2013a). I enstaka fall har immunmedierad hemolytisk anemi hos häst associerats med penicillinbehandling, men orsakssambandet är inte helt klarlagt (Blue *et al.*, 1987; Step *et al.*, 1991, Kendall & Pringle, 2014). Även antibiotikainducerad diarré förekommer vid behandling med bensylpenicillin (Gustavsson, 2004).

Den mest välkända biverkningen är dock så kallad penicillinchock (Olsén *et al.*, 2007). Vid penicillinchock visar hästarna milda till kraftiga centralnervösa symptom i form av bland annat rädsla, backande, stegrande, ataxi, muskeldarrningar, vinglighet och kramper. Ibland faller hästen eller springer in i saker. Symptomen uppkommer vanligen under, eller omedelbart efter, injektion av pc-prok. Oftast återhämtar sig hästen inom några minuter till en timme. Dödsfall förekommer men är ovanligt. Penicillinchock förekommer hos hästar som behandlas med penicillin för första gången så väl som efter många behandlingar. Olika teorier har framlagts om orsaken till penicillinchock, men den idag rådande teorin är att det är en toxisk reaktion på prokainet och inte penicillinet som är orsaken. Teorin stöds av att vid avsiktlig intravenös injektion av prokain eller pc-prok visar hästar liknande symptom som vid penicillinchock (Tobin *et al.*, 1977a; Chapman *et al.*, 1992). Liknande symptom kan även ses hos människor, hundar och katter (Servan-Schreiber & Perlstein, 2010; Kaplan *et al.*, 2011). Begreppet penicillinchock inkluderar vanligen även den ovanligare anafylaktiska reaktionen på penicillinet, då de delvis liknar varandra kliniskt (Olsén *et al.*, 2007).

Det är inte känt hur vanligt förekommande penicillinchock hos häst är, men en fingervisning kan ges av att det under åren 1991-1995 rapporterades 24 biverkningar på pc-prok till Läkemedelsverket, varav 7 dödsfall (Tjälve, 1997). Sannolikt är att många mildare incidenter inte rapporteras, då en studie samlade rapporter om 59 svenska hästar som reagerat på bensylpenicillin under åren 2003-2005, varav endast en dog (Olsén *et al.*, 2007). Av dessa 59 hästar hade två fått pc-na eller -kalium, medan övriga hade fått pc-prok. Den häst som dog hade fått pc-prok. Av de som fått pc-prok reagerade två med hudreaktioner, övriga visade centralnervösa symptom som stämmer väl överens med prokaintoxicitet. Detta ger en indikation om att penicillinchock är ett stort och allvarligt problem.

I hästplasma hydrolyseras prokain snabbt till icke toxiska metaboliter (Tobin *et al.*, 1977b). Den snabba inaktiveringen förklarar varför symptomen på prokaintoxicitet går över relativt snabbt, och även varför intramuskulär injektion av pc-prok normalt inte ger symptom. Troligt är att symptom uppstår när hela eller delar av dosen oavsiktligt injiceras intravenöst (Chapman *et al.*, 1992, Olsén *et al.*, 2007). Vid intramuskulär injektion löses bensylpenicillin-prokain-saltet långsamt upp i muskeln varefter prokain och bensylpenicillin når cirkulationen där prokainet hydrolyseras av esteraser (Tobin *et al.*, 1977a; 1977b). Prokainkoncentrationen i plasma blir därmed inte så hög att den ger toxiska symptom. Vid intravenös injektion stiger däremot koncentrationen snabbt till en hög nivå. Det anses därför viktigt att noggrant aspirera innan pc-prok injiceras intramuskulärt, och byta injektionsplats om blod ses i sprutan. En annan möjlig förklaring är att pc-prok med en hög andel lösligt prokain, till exempel efter förvaring i hög temperatur, gör att prokainet snabbare tas upp vid intramuskulär injektion (Chapman *et al.*, 1992). Allvarlighetsgraden av prokaintoxicitet hos häst är dosberoende (Tobin *et al.*, 1977a; Chapman *et al.*, 1992). Olsén *et al.* (2007) har visat att hästar som har haft en penicillinchock har signifikant lägre aktivitet de esteraser som hydrolyserar prokain i plasma än hästar som har behandlats med pc-prok utan biverkningar. Dock är variationen stor inom båda grupperna, vilket gör att esterasaktiviteten inte ensam kan förklara vilka hästar som riskerar att drabbas av penicillinchock.

För att komma runt problematiken med prokaintoxicitet och samtidigt behålla fördelarna med intramuskulär injektion har försök gjorts att ge pc-na intramuskulärt (Olsén *et al.*, 2013). Vid en dos av 15 mg/kg, q 12 h ger detta tillfredställande plasmanivåer för att behandla vanliga patogener hos häst. Tyvärr visar dock hästarna kraftiga tecken på smärta strax efter injektionen samt svullnad och smärta vid injektionsplatsen, och behandlingsregimen kan därför inte rekommenderas ur djurvälståndsperspektiv. Intramuskulär injektion av bensylpenicillin utan prokain orsakar mer smärta än pc-prok även hos människor (Harari *et al.*, 1988).

Farmakokinetik och farmakodynamik

Farmakokinetik (PK) undersöker koncentration-tidsförloppet av absorption, distribution, metabolism och elimination av läkemedel ("vad kroppen gör med läkemedlet"). Farmakodynamik (PD) är studiet av de biokemiska och fysiologiska effekterna av läkemedel, samt deras verkningsmekanismer ("vad läkemedlet gör med kroppen"). En förståelse för

dessa, både generellt och specifikt för aktuellt läkemedel, är centralt för all läkemedelsforskning.

När det gäller PK/PD för antibiotika har vi fördelen att kunna relatera en läkemedelskoncentration (PK) till effekten på patogenen som man avser avdöda (PD) (Drusano, 2004). Den PD-parameter som används är MIC. MIC är den lägsta koncentrationen av ett antibiotikum *in vitro* som hämmar tillväxten av den aktuella bakterien. MIC varierar mellan bakteriearter och även mellan olika isolat inom en art. De flesta bakterier är extracellulära och det är antibiotikakoncentrationen i den extracellulära vätskan på infektionsplatsen som är avgörande för effekten *in vivo*. Den icke proteinbundna (fria) plasmakoncentrationen (fC) har visat sig vara ett välfungerande surrogat för koncentrationen i extracellulär vätska (Mouton *et al.*, 2008). Detta gör att man vanligen relativt framgångsrikt kan förutsäga hur effektiv en antibiotikadosering kommer att vara genom att administrera läkemedlet till friska individer och ta frekventa blodprover för att mäta plasmakoncentrationen. Det ska dock inte glömmas bort att PK varierar mellan olika individer (Drusano, 2004). Djurets ålder, njurfunktion, kön, hälsotillstånd med mera kan påverka. Även när alla dessa faktorer har tagits hänsyn till kvarstår en viss variation mellan olika individer. Därför bör man inte bara ta hänsyn till medelvärdet av PK-parametrar, utan även hur spridningen mellan olika individer ser ut. Annars finns risken att en dosering rekommenderas som bara ger tillräckligt hög plasmakoncentration hos en del av populationen.

PK/PD-index

När PK och PD för antibiotika integreras får man ett PK/PD-index, som kan användas för att förutsäga hur effektiv en viss dosering kommer att vara för att bekämpa en infektion. Vilken typ av PK/PD-index som är lämpligast varierar mellan olika antibiotikaklasser. Betsylpenicillin och andra betalaktamantibiotika är tidsberoende, vilket innebär att tiden över MIC ($T > MIC$) är det index som fungerar överlägset bäst (Drusano, 2004). Eftersom det endast är den fria plasmakoncentrationen som är farmakologiskt aktiv används uttrycket $fT > MIC$, som vanligen uttrycks som en procentandel (den tid under 24 h då den fria plasmakoncentrationen överstiger bakteriens MIC). Hur stor $fT > MIC$ bör vara är omdiskuterat och varierar bland annat mellan olika bakterier, värdjur och infektionsplatser och vad det kliniska målet är (överlevnad, bakteriostatisk eller baktericid effekt, minimerad resistensutveckling med mera) (Martinez *et al.*, 2013). Generellt är dock flera författare överens om att $fT > MIC$ för betalaktamer bör vara minst ca 30-50% (Drusano, 2004; Adembri & Novelli, 2009; MacGowan, 2011; Martinez *et al.*, 2013). Tidigare har det förespråkats att $fT > MIC$ ska vara minst ca 40-80% (Burgess, 1999; Toutain *et al.*, 2002).

Betsylpenicillinprokainets farmakokinetik hos häst

Betsylpenicillin kombinerades med prokain för intramuskulär administration till hästar redan på 1940-talet för att förlänga $T_{1/2}$ och därmed doseringsintervallet (Doll *et al.*, 1948). Det är absorptionshastigheten och inte eliminationen som begränsar $T_{1/2}$ för pc-prok ("flip-flop-fenomen").

Plasmakoncentration-tidsprofilen efter intramuskulär injektion

Flera studier av plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin efter intramuskulär injektion av pc-prok har gjorts. De flesta är från 1980- och 1990-tal eller äldre och använder gamla analysmetoder, ofta mikrobiologiska, för att fastställa antibiotikakoncentrationen i plasma. Alla har inte heller hanterat blodproverna helt sterilt och med fullgod kylning, för att minska risken att betalaktamaser ska bryta ner penicillinet innan proverna analyseras (Wiese, 1989).

Medelvärden av tiden till maximal koncentration (T_{max}) har visats vara mellan 3 och 4,6 h (Stover *et al.*, 1981; Franklin *et al.*, 1989; Firth *et al.*, 1990; Ensink *et al.*, 1996; Uboh *et al.*, 2000). Med dosen 20 000 – 22 000 IU/kg eller 20 mg/kg (1 mg pc-prok = 900-1050 IU (Plumb, 2011)) varierar medelvärdet av C_{max} mellan 1,42 och 2,06 µg/ml (Stover *et al.*, 1981; Sullins *et al.*, 1984; Franklin *et al.*, 1989; Uboh *et al.*, 2000; Lindberg, 2009). Det finns få rapporter om AUC. Uboh *et al.* (2000) bestämde AUC_{0-36h} till 38,7 h·µg/ml (spann 34,6–59,4 h·µg/ml) och Lindberg (2009) bestämde $AUC_{0-\infty}$ till 23,3 - 27,9 h·µg/ml. I dessa försök har pc-prok givits som en enstaka dos. Medel av C_{min} 24 h efter samma enskilda dos varierar mellan 0,17 och 0,42 µg/ml (Stover *et al.*, 1981; Sullins *et al.*, 1984; Franklin *et al.*, 1989; Lindberg, 2009). $T_{1/2}$ har visats vara i genomsnitt 8-14 h (Firth *et al.*, 1986; Franklin *et al.*, 1989; Firth *et al.*, 1990; Lindberg, 2009), men även betydligt längre $T_{1/2}$ finns rapporterat: 19,7 respektive 24,7 h (Love *et al.*, 1983; Uboh *et al.*, 2000).

Firth *et al.* (1986) visade i en studie att injektionsplatsen vid intramuskulär injektion av pc-prok spelar viss roll för biotillgängligheten och andra PK-parametrar. Medelvärdet för biotillgängligheten (0-72 h) var 78-100% för olika injektionsplatser. Injektion i *M. serratus ventralis cervicis* (lateralt på halsen) gav högst biotillgänglighet av de fyra intramuskulära injektionsplatser som undersöktes, och är även den som vanligen används i Sverige. Subkutan injektion gav signifikant lägre biotillgänglighet än injektion i halsmuskulaturen. Pc-prok är inte registrerad för subkutan användning till häst i Sverige (Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011c). Franklin *et al.* (1989) visade att C_{max} , T_{max} , AUC och $T_{1/2}$ inte påverkades av om dosen ges som en stor intramuskulär injektion i halsmuskulaturen eller uppdelad i mindre mängder på flera injektionsplatser i halsmuskulaturen.

Proteinbindningsgrad

För att beräkna fC behöver man känna till läkemedlets plasmaproteinbindningsgrad. Bensylpenicillins proteinbindningsgrad i hästplasma har bestämts till 52-64% i olika studier (Keen, 1965; Dürr, 1976; Firth *et al.*, 1986; 1990; Olsén *et al.*, 2013). För beräkningar i denna studie har värdet 62,8% ± 1,8% (Olsén *et al.*, 2013) använts, eftersom Olséns studie utfördes på delvis samma hästar som denna, samt att Olsén *et al.* har tagit hänsyn till risken för nedbrytning av penicillin av betalaktamaser genom att hantera proverna sterilt och i kyla.

Doseringsrekommendationer

I produktresumén för Penovet® vet. och Ethacilin® vet. i FASS® vet. 2015 anges att normaldosen pc-prok till häst är 20 mg/kg intramuskulärt en gång dagligen

(Läkemedelsindustriföreningens Service AB, 2011a; 2011c). Dosen anges även som 7 ml/100 kg (300 mg/ml), vilket i praktiken blir 21 mg/kg. Behandlingstiden rekommenderas vara minst 3 dagar. I en studie var detta även den dosering som oftast använts vid fall av biverkningar på pc-prok i Sverige (Olsén *et al.*, 2007).

Flera författare rekommenderar ungefär samma dos som FASS® vet. 2015 (Sullins *et al.*, 1984; Firth *et al.*, 1986; Franklin *et al.*, 1989). Andra rekommenderar två gånger om dagen av ungefär samma dos eller en högre daglig dos (Brown *et al.*, 1984; Love *et al.*, 1983; Giguère & Afonso, 2013; Giguère, 2015). Rekommendationer så lågt som 12 mg/kg en gång dagligen förekommer (Ensink *et al.*, 1996). Vissa författare nämner att behandlingen kan eller bör startas med en injektion av penicillin utan prokain, intramuskulärt eller intravenöst, för att snabbt få upp plasmakoncentrationen, eller att behandlingen ska kombineras med intravenösa injektioner eller dosen höjas vid särskilt allvarliga infektioner. I Plumb's Veterinary Drug Handbook (2011) rekommenderas att pc-prok ges två gånger per dygn (fyra gånger till föl) med dosen 20 000 – 50 000 IU/kg (ca 20-50 mg/kg).

MIC för vanliga patogener hos häst

I tabell 1 redovisas MIC-värden av bensylpenicillin för tre i Sverige vanligt förekommande patogener hos häst. Materialet bakom tabellen kommer från Statens Veterinärmedicinska Anstalts (SVA) rutindiagnostik för diagnostiska prover från häst och bör således representera läget i Sverige relativt väl.

Tabell 1. Fördelning av MIC (ng/ml) av bensylpenicillin för tre bakteriearter (isolat från häst)

Bakterieart	Totalt antal isolat	Fördelning av MIC, antal isolat (procentandel)						
		≤ 30 ng/ml	60 ng/ml	120 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	> 1000 ng/ml
Betahemolyserande streptokocker ^b	367	366 (99,7%)	1 (0,3%)					
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{ab}	143	100 (70%)	41 (27%)	2 (1%)				
<i>Actinobacillus equuli</i> ^c	27			≤ 120 ^d 6 (22%)	11 (41%)	7 (26%)	3 (11%)	

^a : Ej penicillinasbildande

^b : Diagnostiska prover från häst analyserade vid SVA under mars-november 2015, opublicerade uppgifter (Greko, C., SVA, pers. medd., 2015-11-25)

^c : Diagnostiska prover från häst analyserade vid SVA under 2012-2014 (Läkemedelsverket, 2015)

^d : Känsligheten hos analysmetoden för *A. equuli* går endast ned till 120 ng/ml

Exempel på betahemolyserande streptokocker är *Streptococcus equi* subspecies *equi* som orsakar kvarka, och *S. equi* subspecies *zooepidemicus* som förekommer i lågt antal hos friska hästar, men som kan orsaka luftvägsinfektioner. *S. delphini* och övriga koagulaspositiva

stafylokocker (ej penicillinasbildande) har likt *S. aureus* MIC \leq 120 ng/ml (Läkemedelsverket, 2015). De flesta anaeroba arter har även de MIC \leq 120 ng/ml, undantaget *Bacteroides fragilis*-gruppen där de flesta är resistenta. *A. equuli* kan bland annat misstänkas vid septikemi hos föl (Layman *et al.*, 2014). *A. suis*-like och övriga *A. spp* har en MIC-fördelning som liknar *A. equuli* (Läkemedelsverket, 2015). Pc-prok anses inte lämpligt för behandling av infektion med *Actinobacillus spp.* på grund av deras höga MIC, utan intravenös behandling med pc-na är lämpligare (Läkemedelsverket, 2015).

MATERIAL OCH METODER

Hästar

Åtta friska varmblodiga travare användes, varav sju ston och en valack. Hästarna tillhörde Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala. Åldern var 13-23 år och vikten var 474 – 599 kg.

Hästarna utfodrades med hösilage och kraftfoder enligt sina vanliga rutiner, med visst tillskott av extra hösilage i samband med beteendeobservationer före och efter injektionerna. De hölls i individuella boxar med automatiska vattenkoppar. Hästarna hade tillgång till daglig utevistelse i hage, utom den fjärde försöksdagen då täta blodprover togs ur permanent venkateter. Denna dag motionerades de istället genom att tas på promenader.

Försöket var i förväg granskat och godkänt av Djurförsöksetiska nämnden i Uppsala (C173/14).

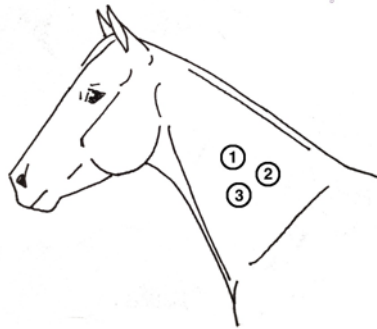
Försöksupplägg

I samband med försöket undersöktes även pc-na med lidokain och adrenalin (pc-lido) som intramuskulär injektion. Pc-lido-delen av försöket presenteras i en annan uppsats (Grossman, 2016). Försöket gjordes i två omgångar med en *cross-overdesign*. I den första omgången slumpades varje häst att behandlas antingen med pc-prok eller pc-lido. Det preparat som användes av pc-prok var Penovet® vet. (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Malmö, Sverige, 300 mg/ml. Hjälpmännen: dinatriumfosfatdihydrat, povidon, lecitin, karmellosnatrium, polysorbat 80, metylparahydroxibensoat (E 218), propylparahydroxibensoat (E 216) och vatten för injektionsvätskor). Pc-lido bereddes enligt följande: 3 gram bensylpenicillin löstes i 5 ml sterilt vatten och 5 ml lidokain med adrenalin (Bensylpenicillin® Meda, Meda, Solna, Sverige, innehåll: 3 g (5 milj IE) bensylpenicillinnatrium; Sterilt vatten Fresenius Kabi, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige; Xyllokain® adrenalin, AstraZeneca, Södertälje, Sverige, innehåll 1 ml: lidokainhydroklorid 10 mg, adrenalin 5 µg, hjälpmännen: natriumklorid, natriummetabisulfat, metylparahydroxybensoat (E218), saltsyra/na-hydroxid, vatten för injektionsvätskor). I omgång två behandlades hästarna med motsatt preparat. *Wash out*-perioden mellan omgångarna var 8 veckor.

Hästarna medicinerades intramuskulärt i fyra dagar vid varje försökstillfälle. Dosen pc-prok var 21 mg/kg kroppsvikt (7 ml/100 kg) en gång dagligen (q 24 h), totalt fyra injektioner. Detta motsvarar 11,9 mg rent bensylpenicillin/kg. Dosen pc-lido var motsvarande 7,5 mg pc-na/kg

(2,5 ml/100 kg) två gånger dagligen (q 12 h), totalt sju injektioner. Volymen av läkemedelslösningen avrundades till närmsta hela ml.

Injektionerna gjordes i halsmuskulaturen, omväxlande på höger och vänster sida och på tre olika genom rakning markerade platser på var sida (se figur 2). Kanylerna som användes för administrering av pc-prok var 18 G (rosa, 1,2 mm x 40 mm, Microlance™ 3, Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Co. Louth, Irland). Om injektionsvolymen översteg 20 ml riktades kanylen om efter injektion av de första 20 ml. Aspiration gjordes innan injektionen påbörjades samt efter att kanylen riktats om. Om blod sågs vid aspiration byttes kanyl och injektionsplats.



Figur 2: Injektionsplatser lateralt på halsen (Grossman, 2015, publicerat med tillstånd).

Under försökets gång togs upprepade blodprover för analys av bensylpenicillin. Även beteendeobservationer gjordes i samband med injektionerna för att upptäcka tecken på smärta och injektionsplatserna undersöktes kliniskt. Data från dessa undersökningar är dock ännu inte analyserade.

Blodprov

Tidpunkter då blodprover togs i timmar från första injektionen var 0 (före första injektionen), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 72,25, 72,5, 73, 74, 75, 77, 80, 84, 96, 108 och 120. Detta innebär att blodprover togs innan varje injektion och 12 h efter första till tredje injektionen. Efter försökets sista (fjärde) injektion togs prov 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24, 36 och 48 h efter injektionen.

Allt arbete med blodproverna gjordes med steril teknik. Blodprover togs med vacutainer ur jugularvenen på motstående sida från den senaste injektionen (0,9x38mm, BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Dagen innan den sista injektionen anlades en permanent venkateter med aseptisk teknik i ena sidans jugularven (14Ga, 13cm Milacath®, Mila International Inc., Erlanger, USA). Därur togs resterande blodprover. Området hade rakats i förväg och lokalbedövningskräm hade applicerats (Emla®, Astra Zeneca, Södertälje, Sverige, 25 mg/g lidokain och 25 mg/g prilokain). Innan varje provtagning togs 10-20 ml blod ur katetern för att tömma ut det som låg i katetern, och efter varje provtagning spolades katetern med 10-20 ml natriumkloridlösning (Natriumklorid, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige, 9 mg/ml).

Alla blodprover togs i (med vacutainer) eller överfördes aseptiskt till (vid provtagning ur venkatetern) förkylda heparinrör och förvarades i isvatten tills de centrifugerades (1500 g, 10 minuter, 4°C). Plasma avskildes till förkylda sterila plaströr och förvarades i -80°C tills de analyserades.

Analys av bensylpenicillin

Analys av bensylpenicillin i plasma utfördes på SVA, Uppsala med validerad metod, *Liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS). Lägsta mätbara koncentration av bensylpenicillin var 6,4 ng/ml. För närmare detaljer kring analysmetoden, se Olsén *et al.* (2013).

PK/PD-analys

Microsoft Office Excel (för Mac, version 15.11.2) användes för analys av data och beräkningar.

Halveringstid ($T_{1/2}$)

$T_{1/2}$ efter sista (fjärde) injektionen beräknades genom att plasmakoncentrationen av bensylpenicillin plottades mot tid i ett log-lin-diagram. En exponentiell regressionslinje anpassades av programmet till de mätvärden som följde en rät linje. Eliminationshastighetskonstanten (β) användes för att räkna ut $T_{1/2}$ enligt ekvation 1.

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\beta} \quad (\text{Ekv. 1})$$

\ln = den naturliga logaritmen

C_{12h} och minsta plasmakoncentrationen (C_{min})

Vid några tillfällen avvek tidpunkten för provtagning vid 12 h (C_{12h}) och 24 h (C_{min}) efter varje injektion något från den planerade. Värdet för C_{12h} och C_{min} beräknades då med hjälp av ekv. 2.

$$C_{12h/min} = C_{prov} \cdot 0,5^{\frac{\Delta t}{T_{1/2}}} \quad (\text{Ekv. 2})$$

C_{prov} = uppmätt koncentration, Δt = differens mellan provtagningstidpunkt och planerad provtagningstidpunkt, $T_{1/2}$ = halveringstid

Area under curve ($AUC_{0-24 h}$)

$AUC_{0-24 h}$ vid *steady state* (efter sista injektionen) beräknades med trapetsmetoden (ekv. 3).

$$AUC_{0-24\text{ h}} = \sum_{i=0, j>i}^{24} \frac{(t_j - t_i) \cdot (C_i + C_j)}{2} \quad (\text{Ekv. 3})$$

t_j = tid vid j-provet (det andra i intervallet), t_i = tid vid i-provet (det första i intervallet), C_i = koncentration i i-provet, C_j = koncentration i j-provet.

Fri plasmakoncentration (fC)

fC beräknades med proteinbindningsgrad 62,8% (Olsén *et al.*, 2013).

Tiden över MIC (fT > MIC)

Tre vanligt förekommande patogener hos hästar i valdes ut för att representera penicillinkänsliga bakterier som ofta behandlas med antibiotika: betahemolyserande streptokocker, *S. aureus* och *A. equuli*. Se litteraturoversikt för dessa bakteriers MIC-fördelningar. För *S. aureus* och *A. equuli* valdes deras högsta uppmätta MIC att representera arten (120 respektive 1000 ng/ml). För betahemolyserande streptokocker valdes 30 ng/ml.

fT > MIC räknades ut för MIC 120 (*S. aureus*) och 30 ng/ml (betahemolyserande streptokocker) enligt följande metod.

fC efter sista injektionen plottades mot tid i ett log-lin-diagram. En exponentiell regressionslinje (ekv. 4) anpassades av programmet till de mätvärden som följde en rät linje (på samma sätt som vid beräkning av $T_{1/2}$).

$$y = ae^{\beta x} \quad (\text{Ekv. 4})$$

y = regressionslinjen (dvs. fC vid tid x), a = tänkt fC vid tid 0, e = basen för \ln (ca 2,72), β = eliminationshastighetskonstanten, x = tid

Genom att sätta y till aktuellt MIC-värde kunde tiden (x) då fC sjönk under MIC räknas ut (ekv. 5):

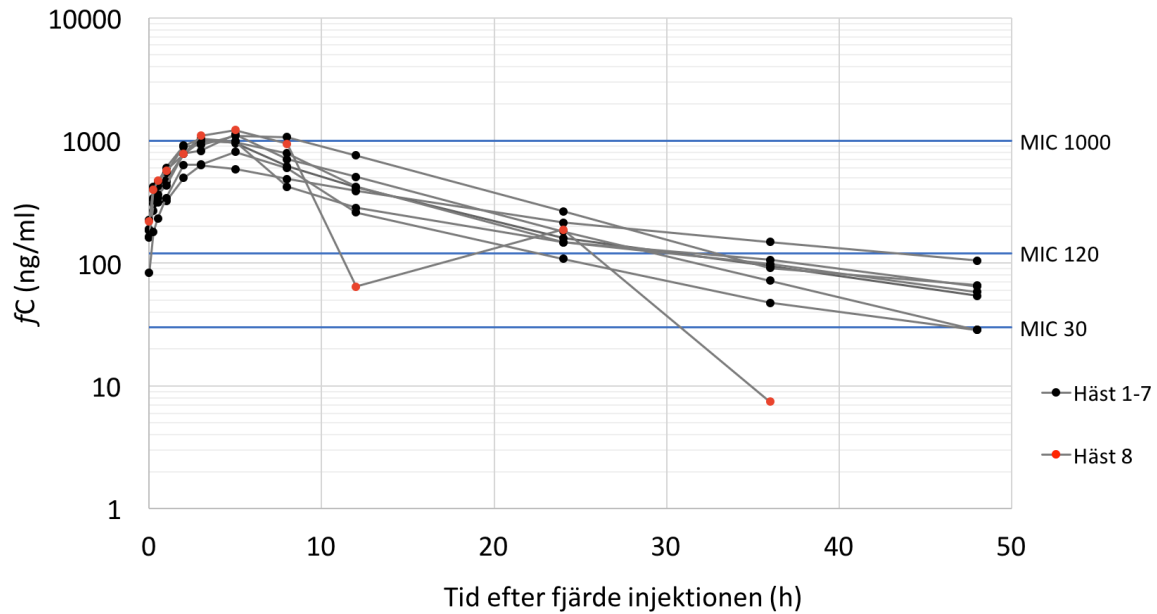
$$x = \frac{\ln(y/a)}{\beta} \quad (\text{Ekv. 5})$$

Tiden då fC steg över MIC sattes till 0 h. För att få fram fT > MIC i % delades tiden (x) med dosintervallet 24 h.

Ovanstående metod kunde inte användas för fT > MIC 1000 ng/ml (*A. equuli*), eftersom fC endast översteg 1000 ng/ml innan 8 h (och hos tre hästar aldrig), vilket var innan mätvärdena började följa regressionslinjen. fT > MIC uppskattades istället ur fC-tid-grafen (log-lin) med ca 0,5 h noggrannhet.

RESULTAT

Tidsprofilen för den fria plasmakoncentrationen efter sista (fjärde) injektionen illustreras i figur 3. Koncentrationen hos en häst (häst 8) avvek med betydligt lägre värden än de andra hästarna vid prov 12, 36 och 48 h efter sista injektionen. Provet vid 24 h var i linje med de andra hästarna. De avvikande provena visas i figur 3, men uteslöts från beräkningar och övriga figurer på grund av att de troligen var felaktiga.



Figur 3: f_C efter sista injektionen pc-prok (21 mg/kg, dosintervall 24 h) för alla åtta hästar, i relation till MIC 30, 120 och 1000 ng/ml. Häst 8 hade avvikande värden vid 12, 36 och 48 h (värdet vid 48 h var ej mätbart, det vill säga $<6,4$ ng/ml).

Farmakokinetik

I tabell 2 presenteras de PK-parametrar som bestämdes. C_{\min} var i genomsnitt 456 ng/ml. Medel av C_{\max} var 2656 ng/ml och T_{\max} nåddes i genomsnitt fyra h efter injektion. $T_{1/2}$ var i genomsnitt 11,36 h. Medel av AUC_{0-24h} var 33330 h·ng/ml.

Regressionslinje för beräkning av $T_{1/2}$ och $fT > MIC$ kunde anpassas väl till mätvärden vid 8-48 h (fem prover) efter sista injektionen hos 7 av hästarna ($R^2 = 0,927-0,999$). För häst 8 användes istället mätvärden vid 5, 8 och 24 h ($R^2 = 0,999$), eftersom proverna vid 12, 36 och 48 h var kraftigt avvikande från de andra hästarna.

Tabell 2. Farmakokinetiska parametrar beräknade från plasmakoncentrationen av bensylpenicillin hos alla åtta hästar. Hästarna injicerades intramuskulärt med pc-prok (21 mg/kg) vid tidpunkterna 0, 24, 48 och 72 h.

Häst	$C_{\min 24h}$ (ng/ml)	$C_{\min 48h}$ (ng/ml)	$C_{\min 72h}$ (ng/ml)	$C_{\min 96h}$ (ng/ml)	$C_{\min tot}$ (ng/ml)	C_{\max} (ng/ml)	T_{\max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24h} (h·ng/ml)
H1	466	566	510	576	531	1692	3	18,24	25365
H2	412	440	497	433	446	2749	3	11,55	31515
H3	330	269	440	399	359	2627	3	11,75	32916
H4	318	677	503	489	497	3018	5	8,56	34947
H5	334	515	436	398	421	2775	3	14,75	27645
H6	388	464	607	712	543	2944	5	9,50	46035
H7	335	301	224	290	288	2173	5	9,63	23694
H8	431	728	589	496	561	3267	5	6,93*	44522
Medel	377	495	476	474	456	2656	4	11,36	33330
±SD	56	163	119	128	126	503	1,1	3,64	8293

C_{\min} : Minimal plasmakoncentration vid 24 h efter varje injektion (omedelbart innan nästa injektion) och totalt (det vill säga medelvärde av de fyra proverna), C_{\max} : maximal uppmätt plasmakoncentration, T_{\max} : tid från injektion till C_{\max} , $T_{1/2}$: halveringstid (beräknad på fem mätvärden, 8-48 h efter injektion), $AUC_{0-24 h}$: area under curve 0-24 h efter injektion, *: beräknad på endast tre mätvärden. C_{\min} baseras på värden efter varje injektion, medan övriga parametrar baseras på mätningar efter den sista injektionen.

Tiden över MIC ($fT > MIC$)

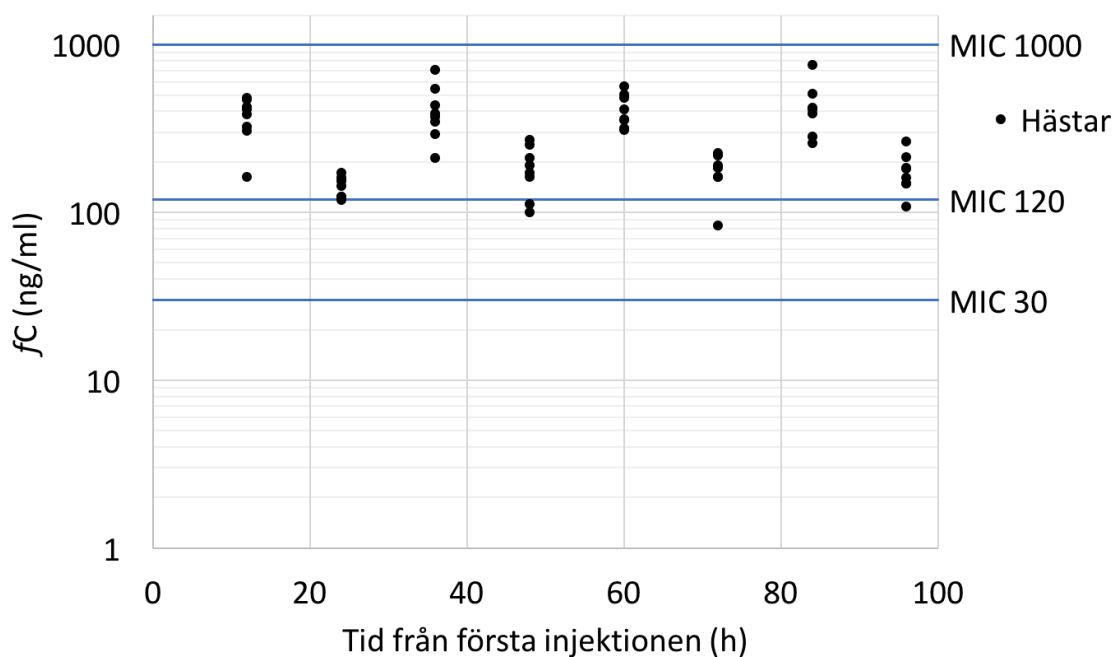
$fT > MIC$ efter sista injektionen pc-prok för samtliga hästar presenteras i tabell 3. För MIC 30 ng/ml (Betahemolyserande streptokocker) och 120 ng/ml (*S. aureus*) var medel 231% respektive 136% och samtliga hästar hade $fT > MIC$ över 100%. För MIC 1000 ng/ml (*A. equuli*) var medel 6% och 3 av 8 hästar hade aldrig fC över 1000 ng/ml.

Tabell 3. Tiden över MIC ($f_T > MIC$) hos de åtta hästarna efter sista injektionen pc-prok (21 mg/kg, q 24 h)

Häst	$f_T > MIC$ (%)		
	MIC 1000 ng/ml <i>Actinobacillus equuli</i>	MIC 120 ng/ml <i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 30 ng/ml Betahemolyserande streptokocker
H1	0	178	330
H2	2	136	232
H3	0	144	242
H4	4	123	194
H5	4	132	255
H6	21	152	231
H7	0	106	187
H8	19	118	176
Medel	6	136	231
±SD	9	22	49

(procentenheter)

I figur 3 illustreras hur f_C vid 12 h ($f_{C_{12h}}$) respektive 24 h ($f_{C_{min}}$) efter varje injektion förhåller sig till olika MIC-värden. För MIC 30 ng/ml var $f_T > MIC$ alltid minst 100%. För MIC 120 ng/ml var $f_T > MIC$ alltid över 50%. Vid 5 av 32 mätillfällen var $f_{C_{min}}$ något lägre än 120 ng/ml, det vill säga $f_T > MIC$ var inte alltid över 100% för MIC 120 ng/ml (tabell 3 visar $f_T > MIC$ endast efter sista injektionen och beräknad på regressionslinjen). För MIC 1000 ng/ml var $f_T > MIC$ aldrig över 50%.



Figur 3: Fria plasmakoncentrationen (f_C) efter halva doseringsintervallet ($f_{C_{12h}}$) samt omedelbart innan nästa injektion ($f_{C_{min}}$) för alla åtta hästar, i relation till olika MIC-värden.

DISKUSSION

Efter intramuskulär injektion av pc-prok till häst var plasmakoncentration-tidsprofilen av bensylpenicillin mer än tillräckligt hög för att behandla infektion med flera vanliga penicillinkänsliga patogener, dock ej *Actinobacillus* spp. Ingen häst blev sjuk eller fick några allvarliga biverkningar under studien. Resultaten är till stor del överensstämmande med tidigare forskning, men vissa skillnader finns.

Häst 8 hade avvikande mätvärden med betydligt lägre koncentrationer än de andra hästarna vid 12, 36 och 48 h efter sista injektionen. Värdet vid 48 h var ej mätbart, det vill säga < 6,4 ng/ml. Vid 24 h var mätvärdet liknande de andra hästarna. Det är svårt att säga varför dessa prover har blivit så avvikande, men troligt är att det representerar något fel i provhanteringen eller analysen. Det är inte troligt att plasmakoncentrationen hos hästen skulle sjunka kraftigt till 12 h och sedan stiga igen till 24 h. Därför uteslöts de avvikande mätvärdena från beräkningar, vilket gör att $T_{1/2}$ endast baseras på tre mätvärden för häst 8. Detta är olyckligt men alternativet hade varit att helt utesluta hästen från studien. Det bedömdes värdefullt att behålla hästen i studien med tanke på att antalet försöksdjur redan var begränsat.

Plasmakoncentration-tidsprofil

T_{max} nåddes efter $4 \pm 1,1$ h vilket stämmer väl överens med tidigare forskning (3 - 4,6 h) (Stover *et al.*, 1981; Franklin *et al.*, 1989; Firth *et al.*, 1990; Ensink *et al.*, 1996; Uboh *et al.*, 2000).

C_{max} kan inte riktigt jämföras med tidigare försök eftersom det uppmättes efter fyra dagars behandling, då *steady state* hade uppnåtts, medan tidigare försök har gjorts på en enstaka dos. Tidigare försök med motsvarande dosering har visat att C_{max} är i genomsnitt 1,42 - 2,06 µg/ml (Stover *et al.*, 1981; Sullins *et al.*, 1984; Franklin *et al.*, 1989; Uboh *et al.*, 2000; Lindberg, 2009). C_{max} vid *steady state* var högre: $2,7 \pm 0,5$ µg/ml. Det är logiskt att C_{max} vid *steady state* blir högre än efter en enstaka dos. Olika beredningsformer kan också påverka C_{max} . I de flesta försök, inklusive detta, har blodprov tagits med 1-2 h intervall vid tiden för C_{max} vilket innebär att den sanna C_{max} kan inträffa både tidigare och senare än vad som uppmäts. Dock bör påverkan av denna faktor begränsas av att upptaget är långsamt och $T_{1/2}$ lång.

C_{min} 24 h efter första injektionen var $0,38 \pm 0,06$ ng/ml, vilket är i linje med tidigare forskning. Studier med motsvarande dosering har funnit att plasmakoncentrationen 24 h efter en injektion är i genomsnitt 0,17 - 0,42 µg/ml (Stover *et al.*, 1981; Sullins *et al.*, 1984; Franklin *et al.*, 1989; Lindberg, 2009). C_{mintot} (genomsnitt av alla C_{min}) var ca $0,46 \pm 0,13$ µg/ml, det var alltså något högre än efter första injektionen men skillnaden var inte särskilt stor. Den enda tidigare studie som redovisar C_{min} efter 4 dagars behandling är Sullins *et al.* (1984), som fann att den då var i genomsnitt 0,4 µg/ml vilket inte avviker avsevärt från våra resultat.

$T_{1/2}$ var i genomsnitt $11,4 \pm 3,6$ h, vilket stämmer mycket väl med majoriteten av tidigare forskning där $T_{1/2}$ varit i genomsnitt 8-14 h (Firth *et al.*, 1986; Franklin *et al.*, 1989; Firth *et al.*, 1990; Lindberg, 2009). Ett par försök har dock visat betydligt längre $T_{1/2}$: 19,7 respektive

24,7 h (Love *et al.*, 1983; Uboh *et al.*, 2000). Variationer i beredningsformen, tex olika hjälpämnen, kan ha stor betydelse för $T_{1/2}$. En bidragande orsak till skillnaden kan även vara hur man väljer att beräkna $T_{1/2}$. I vår studie beräknades den på en regressionslinje av mätvärden 8-48 h efter den sista injektionen (hos alla hästar utom häst 8). Det fanns en tendens i resultatet att plasmakoncentrationen sjönk långsammare ju längre tiden gick. Hade $T_{1/2}$ istället beräknats på tiden 24-48 h så hade den blivit längre. Det är möjligt att detta mer korrekt hade återgivit terminala $T_{1/2}$, men med ökad risk för osäkerhet då det endast hade beräknats på tre mätvärden per häst. Det bedömdes även som mer intressant och kliniskt relevant att återge $T_{1/2}$ som gäller inom doseringsintervallet än terminala $T_{1/2}$ som uppnås först efter 24 h. Möjligt är att den sanna terminala $T_{1/2}$ inte ens nås inom den tid då blodprover togs, utan först senare (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004). $T_{1/2}$ varierade mycket mellan olika hästar. Eftersom den endast kunde beräknas efter den sista dosen (då tillräckligt frekventa blodprover togs), går det inte att säga i hur stor utsträckning detta representerar en skillnad i PK mellan olika individer eller om det mer handlar om en slumpmässig skillnad mellan olika administreringstillfällen.

AUC_{0-24h} vid *steady state* var $33,3 \pm 8,3$ h· $\mu\text{g/ml}$. AUC_{0-24h} vid *steady state* ger samma värde som $AUC_{0-\infty}$ efter en enskild dos (Mouton *et al.*, 2005). De flesta tidigare studier redovisar ej AUC. Uboh *et al.* (2000) bestämde AUC_{0-36h} efter enskild dos till 38,7 h· $\mu\text{g/ml}$ (spann 34,6–59,4) och Lindberg (2009) bestämde $AUC_{0-\infty}$ efter enskild dos till 23,3 - 27,9 h· $\mu\text{g/ml}$ (endast två hästar i försöket). Resultatet i vår studie låg alltså något under Ubohs trots att Uboh beräknade AUC endast för de första 36 h efter en injektion. Ubohs större AUC förklaras av den längre $T_{1/2}$ som troligen beror på beredningsformen. Lindbergs resultat ligger lägre än vårt genomsnitt, men hennes försök omfattade endast två hästar vars AUC ändå ligger inom spridningen i vår studie.

En av de viktigaste faktorerna som bidrar till skillnader mellan olika studier är sannolikt den exakta beredningsformen, det vill säga olika hjälpämnen och sammansättning av bencyclen och prokain. Som exempel kan Franklin (1989) och Uboh (2000) jämföras. Franklin studerade Penovet® Novo. Tyvärr har inte information om eventuella skillnader mellan Penovet® Novo och Penovet® vet. som används idag kunnat hittas. Franklins resultat stämmer väl överens med våra, förutom att C_{max} i Franklins studie är något lägre. Uboh däremot använde en annan produkt (Procaine penicillin G, Phoenix Pharmaceuticals, St Joseph, Mo., USA) och fann en betydligt längre $T_{1/2}$.

En faktor som kan bidra till variation både mellan individer och olika studier är att det är mycket möjligt att läkemedlet fördelas lite olika i muskulaturen vid olika injektionstillfällen. God genomblödning av muskulaturen ökar sannolikt upptagshastigheten, och genomblödningen kan variera med hur mycket hästen rör på sig, till exempel om den går i hage eller inte, och dess hälsotillstånd. Även individuella skillnader mellan hästar som ålder och ras skulle kunna ha viss betydelse. Penicillin utsöndras i princip fullständigt via njurarna, men på grund av flip-flop-fenomenet hos pc-prok påverkas $T_{1/2}$ mer av upptagshastigheten från injektionsplatsen än av clearance och distributionsvolym (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004). Flip-flop-fenomenet gör därmed att variationen i $T_{1/2}$ mellan djur med olika

njurfunktion troligen blir mindre än för exempelvis pc-na vid intravenös injektion. Däremot kan sämre njurfunktion göra att plasmakoncentrationen generellt blir högre.

En annan faktor kan vara att olika analysmetoder för bensylpenicillin i plasma eller serum använts vid olika försök. De flesta äldre studier använder olika former av mikrobiologiska analysmetoder. Varierande noggrannhet i provhanteringen (sterilitet och kylning) är en annan möjlig orsak till varierande resultat. När proverna ej hanteras sterilt finns en risk för kontamination av betalaktamasproducerande bakterier som bryter ned penicillin och skulle kunna ge falskt låga analysresultat (Wiese, 1989). I detta försök gjordes allt arbete med blodproverna med steril teknik och i kyla för att undvika kontaminering och för att nedbrytningshastigheten ökar med temperaturen.

Tiden över MIC ($fT > MIC$)

$fT > MIC$ efter intramuskulär injektion av pc-prok (21 mg/mg) var mer än tillräcklig för god aktivitet mot ej penicillinasbildande *S. aureus* (MIC 120 ng/ml) och betahemolyserande streptokocker (MIC 30 ng/ml) ($136\% \pm 22$ respektive $231\% \pm 49$ efter sista injektionen). Samtliga hästar hade $fT > MIC$ över 100% för dessa MIC när den beräknades på regressionslinjen efter sista injektionen. Dock hade en häst fC_{min} något under 120 ng/ml när detta baserades på faktiska mätvärden efter sista injektionen. Vid ytterligare 4 mätningar under försökets första tre dagar hade någon häst fC_{min} något under 120 ng/ml tidigare under behandlingsperioden. $fT > MIC$ kan alltså sägas oftast, men inte alltid, vara över 100% för MIC 120 ng/ml vid denna dosering.

$fT > MIC$ för *A. equuli* (MIC 1000 ng/ml) var mycket låg ($6\% \pm 9$) och för vissa hästar 0%. Pc-prok kan inte anses lämpligt för behandling av *A. equuli*, eftersom extremt höga doser eller täta dosintervall skulle krävas för tillräckligt stor $fT > MIC$ för många av isolaten. Andra *Actinobacillus* spp. har liknande MIC-fördelning som *A. equuli* vilket innebär att det generellt är olämpligt att behandla *A. spp.* med pc-prok. PK/PD-simuleringar har redan tidigare visat att intravenös behandling med pc-na är lämpligare än pc-prok vid infektion med *A. spp.* (Läkemedelsverket, 2015). Eftersom MIC hos olika isolat av *A. equuli* varierar mellan ≤ 120 och 1000 ng/ml kan dock pc-prok ha tillräckligt god effekt i enstaka fall när bakterien har en låg MIC för sin art (se litteraturöversikten för fördelning av MIC-värden). *A. spp.* kan misstänkas vid septikemi, framförallt hos föl, peritonit med okänd etiologi och luftvägsinfektioner, men förekommer även vid infektioner i ben och leder, hud, orofarynx, reproduktionsorganen med mera (Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, 2013; Layman *et al.*, 2014). I klinisk praktik bör om möjligt odling tas från infektionen för att kunna basera terapival på aktuell patogen, MIC-värde och eventuell antibiotikaresistens.

Ingen tidigare studie har hittats i litteraturen som beräknar $fT > MIC$ för pc-prok till häst på ett sätt som gör resultaten jämförbara med våra. Med tanke på att plasmakoncentrationstidsprofilen av bensylpenicillin är liknande i de flesta studier, är det dock troligt att om detta hade beräknats så hade resultaten varit likartade.

I detta arbete valdes MIC för *Actinobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. och betahemolyserande streptokocker som representanter för vanliga penicillinkänsliga patogener hos häst. För betahemolyserande streptokocker valdes 30 ng/ml att representera arten, trots att ett isolat i statistiken från SVA hade 60 ng/ml, eftersom detta endast representerade 0,3% av proverna (se litteraturoversikten). Det bedömdes som mer intressant att se hur stor $f_T > MIC$ var i relation till majoriteten av streptokockisolaten. Vad gäller *A. equuli* och *S. aureus* är det även för dem få av isolaten som har de högsta uppmätta MIC (11% respektive 1%). De högsta MIC-värdena valdes ändå som representanter för dem, dels för att andelen isolat med höga MIC var något större, dels för att deras MIC är högre och därmed är risken för underdosering större.

Vid uträkning av $f_T > MIC$ för MIC 30 och 120 ng/ml förutsattes att f_C var över MIC redan när sista injektionen gjordes. För alla hästar utom häst 7 var f_C över 120 ng/ml vid provtagning omedelbart innan sista injektionen ($C_{\min 72h}$), och för häst 7 nådde f_C över 120 ng/ml mycket snart efter sista injektionen.

Generaliserbarhet

Endast åtta hästar varav alla vuxna varmlodiga travare användes i försöket. Det är svårt att säga i vilken utsträckning resultaten för denna studie kan generaliseras till att gälla andra hästar under andra omständigheter. Att andra studier av tidsprofilen för plasmakoncentrationen har fått liknande resultat stödjer dock att resultaten är generaliserbara. En Monte Carlo-simulering utgående från medelvärden och standardavvikelse i denna studie skulle kunna göras för att simulera tidsprofilen för fler hästar.

Flera faktorer kan påverka hur tidsprofilen ser ut för en häst som i kliniken behandlas med pc-prok. En del av dessa har redan diskuterats i jämförelsen med tidigare forskning. De två preparat av pc-prok som finns i Sverige (Penovet® vet. och Ethacilin® vet.) har inte exakt samma beredningsform och det är möjligt att tidsprofilen skiljer sig åt mellan dem. Läkemedlet kan även påverkas av förvaring i olika temperaturer. Förvaring i 50 grader under ett dygn ökar signifikant andelen lösligt prokain vilket troligen innebär ett snabbare upptag och därmed en kortare $T_{1/2}$ (Chapman *et al.*, 1992). Hög temperatur kan vara ett problem exempelvis om läkemedlet förvaras i en bil en varm sommardag. Tillverkarna rekommenderar att både Penovet® vet. och Ethacilin® vet. förvaras i kylskåp (2-8°C). Även olika injektionsplatser spelar roll för absorptionen (Firth *et al.*, 1986). Brown *et al.* (1984) visade att tidsprofilen för plasmakoncentration efter intramuskulär injektion av pc-prok till föl skiljer sig något från vuxna hästar, med högre koncentrationer tidigt under förloppet och lägre senare. Brown drar dock slutsatsen att skillnaden inte är större än att samma dos kan ges och rekommenderar dosen 20 000 IU/kg (ca 20 mg/kg), q 12 h till både föl och vuxna hästar. Detta är att jämföra med 20-21 mg/kg, q 24 h som rekommenderas av tillverkaren av Penovet® vet. Med en lägre doseringsrekommendation än den Brown *et al.* ger kan skillnaden mellan föl och vuxna spela större roll.

Doseringsrekommendation

Hur stor $fT > MIC$ bör vara är, som tidigare nämnts, en omdiskuterad fråga. Flera författare är dock överens om att $fT > MIC$ bör vara minst ca 30-50% (Drusano, 2004; Adembri & Novelli, 2009; MacGowan, 2011; Martinez *et al.*, 2013). Detta innebär att doseringen av pc-prok antagligen skulle kunna minskas med bibehållen god aktivitet mot bakterier med MIC 120 ng/ml eller lägre. Ytterligare forskning där lägre doseringar provas skulle vara intressant. Om man följer tumregeln att halverad dos innebär att en $T_{1/2}$ förloras i $fT > MIC$ kan en ungefärlig $fT > MIC$ för halva dosen beräknas. För våra försökshästar innebär det att $fT > MIC$ vid *steady state* för dosen 10,5 mg/kg (q 24 h) skulle bli ca 66-113% (medel 89%) för MIC 120 ng/ml (*S. aureus*). Detta skulle alltså troligen vara tillräckligt för infektion med *S. aureus*. Eftersom betahemolyserande streptokocker, *S. delphini*, övriga koagulaspositiva stafylokocker (ej penicillinasbildande) och många anaerober (undantaget *Bacteroides fragilis*-gruppen) har liknande eller lägre MIC-fördelning som *S. aureus* (≤ 120 ng/ml) har de även ungefär samma eller större $fT > MIC$ (Läkemedelsverket, 2015). En lägre dosering skulle alltså troligen fungera bra även vid infektion med dessa bakterier.

Tidigare doseringsrekommendationer är, som nämnts i litteraturöversikten, varierande. Troligen beror detta till stor del på att kunskaperna om PK/PD har varierat med tidpunkt och författare och detta påverkar hur man använder resultaten från studier för att komma fram till doseringsrekommendationer. Exempelvis tar flera äldre artiklar inte hänsyn till proteinbindningsgrad. Ibland används tumregler som att plasmakoncentrationen ska vara två till fem gånger MIC (Love *et al.* 1983; Sullins *et al.*, 1984). Även vilket värde av MIC man använder påverkar, beroende på vilken eller vilka bakterier man utgår från samt dess känslighet i de analyser man har tillgång till. Tidigare ansåg många att plasmakoncentrationen skulle överstiga MIC under en större del av dosintervallet än vad som idag anses nödvändigt (Love *et al.*, 1983; Burgess, 1999; Toutain *et al.*, 2002). Naturligtvis påverkar även varierande PK i de studier man utgår från, men doseringsrekommendationerna varierar mer än PK.

En fördel med en lägre dosering är att det möjligen skulle kunna minska risken för prokaintoxicitet i samband med penicillinbehandling. Prokaintoxicitet vid avsiktlig intravenös injektion av prokain ger kraftigare symptom vid högre dos (Tobin *et al.*, 1977a; Chapman *et al.*, 1992). Prokaintoxicitet vid intramuskulär injektion av pc-prok beror troligen på att hela eller delar av dosen oavsiktligt injiceras intravenöst, alternativt att en ovanligt stor del av prokainet i läkemedlet är löst och därmed tillgängligt för snabb absorption (Chapman *et al.*, 1992; Olsén, 2007). Det är därför rimligt att anta att en lägre dos troligtvis skulle minska risken för och allvarlighetsgraden av prokaintoxicitet. 21 mg/kg av pc-prok motsvarar 8,4 mg prokain/kg och Chapman *et al.* (1992) visade att hästar får symptom på prokaintoxicitet redan vid intravenös injektion av 2 mg/kg prokain HCl. Symptomen blir dock värre vid 5 mg/kg och ännu värre vid 10 mg/kg. Chapman *et al.* gav även intravenös injektion av pc-prok till en häst som även den visade symptom på prokaintoxicitet, vilken dos som då användes är dock otydligt uttryckt i artikeln.

Med tanke på prokaintoxicitetens ofta dramatiska natur, med risk för skador både för häst och människa, är det troligt att många djurägare och även vissa veterinärer som en gång sett det

hända tvekar inför att använda pc-prok igen, framförallt till samma häst men även till andra hästar. Behandlingen avbryts vanligen efter en reaktion och ersätts i vissa fall med intravenös giva av bensylpenicillin eller oral behandling med trimetoprim-sulfadiazin (Olsén *et al.*, 2007). Till skillnad från bensylpenicillin påverkar trimetoprim-sulfadiazin även många gramnegativa bakterier, och det är därför olyckligt om trimetoprim-sulfadiazin används i onödan med tanke på risken för resistensutveckling (Prescott, 2013b). Dessutom fungerar bensylpenicillin bättre än trimetoprim-sulfadiazin vid vissa typer av infektioner (Ensink *et al.*, 2003). Om en minskad doseringsrekommendation skulle innebära mindre risk för prokaintoxicitet och därmed att fler djurägare och veterinärer vågade använda pc-prok, skulle det följaktligen i många fall vara positivt med tanke på både resistensutveckling och klinisk effekt.

En annan fördel med lägre dosering skulle vara att den så kallade *Eagle effect* minskar. *Eagle effect* innebär att för vissa grampositiva kocker ger en exponering för betalaktamer över optimal avdödande koncentration en minskad avdödning (Prescott, 2013a). Effekten verkar bero på att penicillin i höga koncentrationer binder till andra penicillinbindande proteiner hos bakterien än de normalt gör, vilket hämmar bakteriens tillväxt. Eftersom betalaktamer är effektivt endast mot växande bakterier som producerar ny cellvägg, resulterar den hämmade tillväxten i hämmad avdödning.

Det finns även risker med att sänka doseringen av pc-prok. Behandling sätts ibland in i väntan på provsvar eller utan provtagning, vilket innebär att veterinären inte vet vilken bakterie som behandlas. Om det då visar sig vara en bakterie med högre MIC än 120 ng/ml, exempelvis en *Actinobacillus* spp. med MIC 250 eller 500 ng/ml, kanske dosen 21 mg/kg hade haft tillräcklig effekt, medan en lägre dos inte har det. Under vissa omständigheter kan penetransen av läkemedlet till infektionsområdet försämrats, tex. vid bölder. Kliniska data som visar vilka preparat och doseringar som är lämpligt vid bölder med stafylokocker och streptokocker saknas, men eventuellt krävs intravenös behandling för effektiv terapi (Läkemedelsverket, 2015). Om man trots det väljer att använda pc-prok vid bölder är det troligt att en lägre dos ger större risk för terapivikt.

En sänkt doseringsrekommendation kan medföra en oro för en ökad risk för resistensutveckling. Suboptimala koncentrationer kan riskera att selektera fram mer resistent bakteriestammar, men optimal dosering för att undvika selektion eller uppkomst av antibiotikaresistens är ännu inte fullständigt studerat (Burgess, 1999; Drusano, 2004; Martinez *et al.*, 2013). Det är möjligt att något högre koncentrationer krävs för att minimera resistensutvecklingen än vad som krävs för klinisk effekt. Med tanke på den mycket goda marginal som finns med dosen 21 mg/kg bör dock dosen kunna sänkas utan att nämnvärt öka risken för resistensutveckling.

Det ovan nämnda räkneexemplet (att dosen 10,5 mg/kg q 24 h skulle ge ungefär $fT > MIC$ (MIC 120 ng/m) 66-113%) är baserat på beräkningar vid *steady state*. Det är eftersträvansvärt att tillräckligt höga koncentrationer nås redan under det första dygnets behandling, både med tanke på klinisk effekt och risk för resistensutveckling (Martinez *et al.*, 2012). C_{min} efter första dosen är lägre än efter efterföljande doseringar vilket antyder att $fT > MIC$ antagligen också

är lägre, men eftersom skillnaden i C_{\min} inte är betydande borde inte heller skillnaden i $fT > MIC$ vara det. Om skillnaden är så stor att det har betydelse är en högre dos första behandlingsdagen är ett sätt att snabbt nå tillräckligt stor $fT > MIC$.

Biverkningar

I samband med denna studie observerades hästarna under sex minuter innan och efter varje injektion för att upptäcka tecken på smärta i hästarnas beteende. Hästarna undersöktes även klinisk för att upptäcka eventuell svullnad och smärta vid injektionsplatserna. Resultaten av dessa undersökningar har ännu inte analyserats, men det preliminära intrycket är att hästarna inte visade tydliga tecken på smärtbeteende. Dock förekom lindrig till måttlig svullnad och ömhet vid injektionsplatserna hos vissa hästar. Analys av data bör inväntas innan några definitiva uttalanden görs angående detta. Några andra biverkningar sågs inte.

Konklusion

Pc-prok (Penovet® vet.) i den dos som rekommenderas av tillverkaren (21 mg/kg intramuskulärt dagligen) till häst ger mer än tillräckligt höga plasmakoncentrationer av bencyclenpenicillin för att behandla flera vanliga penicillinkänsliga patogener hos häst, däribland betahemolyserande streptokocker och *S. aureus*. Koncentrationen är dock i många fall inte tillräckligt hög för att behandla *A. equuli* och andra *Actinobacillus* spp. Troligen skulle dosen kunna sänkas med bibehållen god effekt mot många vanliga penicillinkänsliga patogener. En förhoppning finns om att en lägre dosering kan innebära en minskad risk för penicillinchock på grund av prokaintoxicitet.

TACK

Ett stort tack riktas till mina handledare Lena Olsén och Carina Ingvast Larsson. Tack för att jag fick vara med och bidra till er spännande forskning och för all stöd och hjälp i arbetet med analys av data och i skrivprocessen!

Tack även till mina medstudenter Judith Grossman och Mathilda Axelsson för stunderna i stallet och på labbet samt framförallt till Judith för många långa uppmuntrande telefonsamtal under arbetet med uppsatsen.

Tack till stallpersonalen för gott samarbete under den praktiska delen av försöket och till Ulf Bondesson (SVA) för utförande av blodprovsanalyserna. Tack även till Christina Greko (SVA) som bidrog med aktuella MIC-värden från SVAs diagnostik.

Stiftelsen Hästforskning har bidragit till finansieringen av projektet.

Till slut ett stort tack till våra tålmodiga försökshästar!

REFERENSER

- Adembri, C., Novelli, A. (2009). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters of Antimicrobials - Potential for Providing Dosing Regimens that Are Less Vulnerable to Resistance. *Clinical Pharmacokinetics*, 48: 517-528
- Baggot, J. D., Love, D. N., Love, R. J., Raus, J., Rose, R. J. (1990). Oral dosage of penicillin V in adult horses and foals. *Equine Veterinary Journal*, 22: 290-291.
- Blue, J. T., Dinsmore, R. P. & Anderson, K. L. (1987). Immune-mediated hemolytic-anemia induced by penicillin in horses. *Cornell Veterinarian*, 77: 263-276.
- Brown, M. P., Gronwall, R. R., Boos, D. & Beal, C. (1984). Aqueous procaine penicillin G in foals: Serum concentrations and pharmacokinetics after a single intramuscular dose. (1984). *Equine Veterinary Journal*, 16: 374-375.
- Burgess, D. S. (1999) Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. *Chest*, 115: 19S-23S.
- Chapman, C.B., Courage, P., Nielsen, I. L., Sitaram, B. R. & Huntington, P.J. (1992). The role of procaine in adverse reactions to procaine penicillin in horses. *Australian Veterinary Journal*, 69: 129-133.
- Doll, E. R. & Dimock, W. W. (1946). Penicillin dosage and blood levels for horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 108: 209-214.
- Doll, E. R., Wallace, M. E. & Newton, A. C. (1948). Serum level response of horses to procaine penicillin in oil and penicillin in oil and wax. *Veterinary Medicine*, 43: 512-517
- Drusano, G. L. (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: Critical interactions of 'bug and drug'. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 289-300.
- Ducharme, N. G., Dill, S. G., Shin, S. J., Schwark, W. S., Ducharme, G. R. & Beilman, W.W (1983). Phenoxymethyl Penicillin in the Horse - an Alternative to Parenteral Administration of Penicillin. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47: 436-439.
- Dürr, A. (1976). Comparison of the pharmacokinetics of penicillin G and ampicillin in the horse. *Research in Veterinary Science*, 20: 24-29.
- Ensink, J.M., Klein, W.R., Barneveld, A., Vulto, A.G., van Miert, A.S.J.P.A.M., & Tukker, J.J. (1996). Distribution of penicillins into subcutaneous tissue chambers in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19: 439-444.
- Ensink, J. M., Smit, J. A. H. & van Duijkeren, E. (2003) Clinical efficacy of trimethoprim/sulfadiazine and procaine penicillin G in a *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* infection model in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26: 247-252.
- Firth, E. C., Nouws, J. F. M., Driessens, F., Schmaetz, P., Peperkamp, K. & Klein, W. R. (1986). Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicillin G in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 47: 2380-2384.
- Firth, E. C., Nouws, J. F. M., Klein, W. R. & Driessens, F. (1990) The effect of phenylbutazone on the plasma disposition of penicillin G in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13:179-185.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillinum, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10:226-236.

- Franklin, A., Rantzien, M. H. Af. & Ryden, L. (1989). Farmakokinetiska studier. Prokain-penicillin G och kalium-penicillin G i plasma och synovia hos häst. *Svensk Veterinärtidning*, 41: 27-32.
- Giguère, S. (2015). Bacterial Pneumonia and Pleuropneumonia. I: Smith, B. P. (red), *Large Animal Internal Medicine*. 5. ed. St. Louis: Mosby, 471-481.
- Giguère, S. & Afonso, T. (2013). Antimicrobial Drug Use in Horses. I: Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M. (red), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 79-103.
- Grossman, J. (2016). *Tidsförlopp för plasmakoncentrationen av bensylpenicillin efter intramuskulär administration av bensylpenicillin med tillsats av lidokain med adrenalin till häst*. Sveriges lantbruksuniversitet. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2016:18)
- Gustavsson, A. (2004). Antibiotic Associated Diarrhea in Horses. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Harari, M., Mathias, A. & Sembo, J. (1988). A comparison of pain induced by procaine and benzyl penicillin. *Papua New Guinea Medical Journal*, 31:169-171.
- Horspool, L. J. I. & McKellar, Q. A. (1995). Disposition of penicillin G sodium following intravenous and oral administration to *equidae*. *British veterinary journal*, 151: 401-412.
- Kaplan, M. I., Lee, J. A., Hovda, L. R. & Brutlag, A. (2011). Adverse effects associated with inadvertent intravenous penicillin G procaine–penicillin G benzathine administration in two dogs and a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238: 507-510.
- Kendall, A., Pringle, J. (2014). Immune-mediated haemolytic anemia: Drug induced or not? *Equine Veterinary Education*, 26: 234-236
- Keen, P. M. (1965). The binding of three penicillins in the plasma of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 25: 507-514.
- Layman, Q., Rezabek, G. B., Ramachandran, A., Love, B. C., Confer, A. W. (2014). A retrospective study of equine actinobacillosis cases: 1999-2011. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26: 365-375
- Lee, M. S. & Kerns, E. H. (1999). LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*, 18: 187-279
- Lindberg, J. (2009). *En farmakokinetisk pilotstudie av olika beredningar av bensylpenicillin intramuskulärt till häst*. Sveriges lantbruksuniversitet. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2009:22)
- Love, D. N., Rose, R. J., Martin, I. C. A. & Bailey, M. (1983). Serum concentrations of penicillin in the horse after administration of a variety of penicillin preparations. *Equine Veterinary Journal*, 15: 43-48.
- Läkemedelsindustriföreningens Service AB (2011a–04–06). *Penovet® vet*.
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19551005000017> [2015-11-30]
- Läkemedelsindustriföreningens Service AB (2011b-09–06). *Geepenil® vet*.
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19980515000017> [2015-11-30]
- Läkemedelsindustriföreningens Service AB (2011c-06-20). *Ethacilin® vet*.
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19910816000010> [2015-11-30]

- Läkemedelsverket. (2015). *Dosering av antibiotika till häst - behandlingsrekommendation*. Information från Läkemedelsverket, supplement oktober/november 2015, årgång 26. Uppsala: Läkemedelsverket.
- MacGowan, A. (2011). Revisiting Beta-lactams - PK/PD improves dosing of old antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, 11: 470-476.
- Martinez, M. N., Papich, M. G. & Drusano, G. L. (2012). Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 2795-2805.
- Martinez, M., Toutain, P. L., Turnridge, J. (2013). The Pharmacodynamics of Antimicrobial Agents. I: Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M. (red), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 79-103.
- Mouton, J. W., Dudley, M. N. & Cars, O. (2005). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 601-607
- Mouton, J. W., Theuretzbacher, U., Craig, W. A., Tulkens, P. M., Derendorf, H. & Cars, O. (2008). Tissue concentrations: do we ever learn? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 235-237.
- Olsén, L., Ingvast-Larsson, C., Broström, H., Larsson, P. & Tjälve, H. (2007). Clinical signs and etiology of adverse reactions to procaine benzylpenicillin and sodium/potassium benzylpenicillin in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30: 201–207.
- Olsén, L., Bremer, H., Olofsson, K., Bröjer, J., Bondesson, U., Bergh, A., Nostell, K., Broström, H., Bengtsson, B. & Ingvast-Larsson, C. (2013). Intramuscular administration of sodium benzylpenicillin in horses as an alternative to procaine benzylpenicillin. *Research in Veterinary Science*, 95: 212–218.
- Plumb, D. C. (2011). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 7. ed. Stockholm, Wisconsin: PharmaVet Inc.
- Prescott, J. F. (2013a). Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. I: Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M. (red), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 79-103.
- Prescott, J. F. (2013b). Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. I: Giguère, S., Prescott, J. F., Dowling, P. M. (red), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 79-103.
- Schwark, W. S., Ducharme, N. G., Shin, S. J., Beilman, W. T. & Elwell, J. T. (1983). Absorption and distribution patterns of oral phenoxymethyl penicillin (penicillin V) in the horse. *Cornell Veterinarian*, 73: 314-322
- Servan-Schreiber, D. & Perlstein, W. M. (2010). Selective limbic activation and its relevance to emotional disorders. *Cognition and Emotion*, 12: 331-352.
- Step, D. L., Blue, J. T. & Dill, S. G. (1991). Penicillin-induced hemolytic-anemia and acute hepatic failure following treatment of tetanus in a horse. *Cornell Veterinarian*, 81: 13-18.
- Stover, SM., Brown, MP., Kelly, RH., Farver, TB. & Knight, HD. (1981). Aqueous procaine penicillin-G in the horse – serum, synovial, peritoneal, and urine concentrations after single-dose intramuscular administration. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 629-631.

- Sullins, K. E., Messer, N. T. & Nelson, L. (1984). Serum concentration of penicillin in the horse after repeated intramuscular injections of procaine penicillin-G alone or in combination with benzathine penicillin and or phenylbutazone. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 1003-1007.
- Sullivan, N. P., Symmes, A. T., Miller, H. C. & Rhodehamel, H. W. (1948). A new penicillin for prolonged blood levels. *Science*, 107: 169-170.
- Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap (2013). Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård.
- Swedres-Svarm (2014). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala. (ISSN 1650-6332)
- Tjälve, H. (1997). Adverse reactions to veterinary drugs reported in Sweden during 1991-1995. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20: 105-110.
- Tobin, T., Blake, J. W., Sturma, L., Arnett, S. & Truelove, J. (1977a). Pharmacology of procaine in the horse: pharmacokinetics and behavioural effects. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 637-647.
- Tobin, T., Tai, C. Y., O'Leary, J. O., Sturma, L., Arnett, S. (1977b). Pharmacology of Procaine in the Horse: Evidence Against the Existence of a "Procain-Penicillin" Complex. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 437-442.
- Toutain, P. L. & Bousquet-Mélou, A. (2004). Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27: 427-439
- Toutain, P. L., Del Castillo, J. R. E., Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*, 73: 105–114
- Uboh, C. E., Soma, L. R., Luo Y., McNamara, E., Fennell, M. A., May, L., Teleis, D. C., Rudy, J. A. & Watson, A. O. (2000). Pharmacokinetics of penicillin G procaine versus penicillin G potassium and procaine hydrochloride in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 61: 811-815.
- Wiese, B. (1989). *Bioanalysis of benzylpenicillin: determinations of low drug concentrations in milk, plasma and lymph by digital subtraction chromatography – a new technique to reduce disturbances from interfering substances*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.